



**Virgília Sofia Almeida  
de Azevedo e Silva**

**Estudo do papel da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase na acção  
neurotóxica do alumínio**



**Virgília Sofia Almeida  
de Azevedo e Silva**

**Estudo do papel da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na acção  
neurotóxica do alumínio**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Catarina Isabel Neno Resende de Oliveira, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Apoio financeiro do POCTI no âmbito  
do III Quadro Comunitário de Apoio.

Apoio financeiro da FCT no âmbito do  
programa PRAXIS XXI.

## **o júri**

presidente

Professor Doutor António José Venâncio Ferrer Correia, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Catarina Isabel Neno Resende de Oliveira, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Co-orientadora).

Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, Professora Associada da Universidade de Aveiro (Orientadora).

Professora Doutora Ana Cristina Carvalho Rego, Professora Auxiliar da Faculdade Medicina da Universidade de Coimbra.

Professor Doutor Manuel Aureliano Alves Pereira Martins, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, desejo expressar a minha mais profunda admiração e sincera gratidão, pelo total e incondicional apoio, amizade, disponibilidade e orientação científica deste trabalho, cuja revisão atenta e análise detalhada tornaram possível esta dissertação.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira a cedência de ensinamentos e de meios técnicos, que permitiram a realização de partes importantes deste trabalho.

Ao Dr. Thomas Pressley da “Texas Tech University, Health Sciences Center” pela generosa oferta de anticorpos.

Gostaria também de expressar um especial agradecimento às Professoras Doutoras Raquel Seíça e Cristina Rego, bem como aos meus colegas de laboratório.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e ao Centro de Neurociências de Coimbra um agradecimento muito especial pelas facilidades concedidas e que tornaram possível a realização do presente trabalho.

Aos meus Pais pelo encorajamento e paciência, que sempre me dispensaram e foram tão decisivos na concretização deste trabalho.

À Universidade de Aveiro, pelo imprescindível apoio financeiro, que tornou possível a realização deste trabalho, designadamente, através da concessão de uma Bolsa de Doutoramento, desde Outubro de 1998 a Dezembro de 1999.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo imprescindível apoio financeiro, que tornou possível a realização deste trabalho, designadamente, a bolsa de doutoramento PRAXIS XXI/BD/21343/99 e o projecto POCTI/BSE/46721/02.

## palavras-chave

alumínio, (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, neurotoxicidade, sinaptossomas, rato.

## resumo

O alumínio é um agente neurotóxico cujo mecanismo de acção permanece por esclarecer. A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase é avaliada em estudos neurotoxicológicos, como indicador da actividade da membrana plasmática das células nervosas. Esta enzima hidrolisa ATP e estabelece e mantém os gradientes de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> através da membrana plasmática de todas as células eucarióticas. Quando integrada na membrana, a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase apresenta uma estrutura oligomérica ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>, assegurada pela interacção dum número variável de protómeros  $\alpha\beta$ . O padrão de expressão das isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  é característico de cada tipo de célula, conferindo características distintas à actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, nomeadamente a sensibilidade ao inibidor selectivo ubaína. Este trabalho pretende evidenciar a participação da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase no mecanismo de acção neurotóxico do alumínio e caracterizar o efeito inibitório do alumínio na actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. A administração, por via oral, de 120 mg de AlCl<sub>3</sub>/kg de peso corporal aumentou transitoriamente a concentração de Al<sup>3+</sup> na circulação sistémica, na urina e nas fezes do rato Wistar macho, jovem e adulto. A exposição prolongada a AlCl<sub>3</sub> [3,6 g durante 120 dias (0,03 g/dia)] provocou um aumento de ~7 ng Al<sup>3+</sup>/mg de proteína nos terminais pré-sinápticos isolados (sinaptossomas) do córtex cerebral e a inibição (30%) da actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. O efeito inibitório do alumínio também foi verificado nos ensaios *in vitro*, revelando-se dependente da concentração de AlCl<sub>3</sub> no meio de reacção. A inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase pela acção do alumínio, *in vivo* e *in vitro*, impede a activação adicional por concentrações elevadas de ATP, reduzindo a velocidade máxima da reacção hidrolítica. O efeito inibitório só foi observado na presença de concentrações saturantes de ATP e parece implicar a diminuição do grau de oligomerização da enzima, diminuindo o número de protómeros que constituem a estrutura oligomérica da proteína integrada na membrana. A exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub> inibiu as isoenzimas do cérebro e do rim, sem modificar o padrão de expressão da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. A análise da dependência da actividade enzimática em função da concentração de ubaína demonstrou a inibição por alumínio de todas as isoenzimas. Por análise densitométrica das proteínas imunodetectadas com anticorpos específicos, não se registaram alterações na expressão das subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . *In vivo* e *in vitro*, o efeito do alumínio na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase mantém as suas características principais. Enquanto que a análise da fluidez de membrana, da razão molar colesterol/fosfolípidos totais e do balanço prooxidante-antioxidante nos sinaptossomas revelou que, após exposição *in vivo* a alumínio, estes parâmetros apresentam alterações distintas das induzidas pela presença de alumínio no meio de reacção (*in vitro*). A inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase parece ocorrer na fase inicial da acção neurotóxico do alumínio, porque não foram observadas evidências de morte celular/disrupção da membrana, de diminuição de energia e de alteração do gradiente transmembranar de Na<sup>+</sup> nos sinaptossomas do córtex cerebral do rato. A ultra-estrutura dos sinaptossomas, bem como a libertação da lactato desidrogenase, os níveis dos nucleótidos de adenina endógenos, a razão ATP/ADP, o potencial de carga energética adenínica e a acumulação do ácido  $\gamma$ -aminobutírico mantiveram-se inalterados após a exposição oral a 3,6 g de AlCl<sub>3</sub> durante 120 dias (0,03 g/dia).



## keywords

aluminium, (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, neurotoxicity, synaptosomes, rat.

## abstract

Aluminium is a neurotoxic agent, but its mechanism of action remains unclear. Within the context of neurotoxicological studies, (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity is evaluated as an indicator of nervous cells plasma membrane function. This enzyme hydrolyses ATP and establishes and maintains the K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> gradients across the plasma membrane of all eukaryotic cells. Within the plasma membrane, (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase presents an oligomeric structure ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub> ensured by the interaction of a variable number of  $\alpha\beta$  protomers. The expression patterns of  $\alpha$  and  $\beta$  subunit isoforms are cell-specific, which award distinct characteristics to (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity, namely the sensitivity to the selective inhibitor ouabain. The aim of this work is to show the involvement of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase in aluminium neurotoxicity and to characterize the aluminium inhibitory effect on (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity.

The oral administration of 120 mg of AlCl<sub>3</sub>/kg of body weight transiently increased aluminium concentration in blood, urine and faeces of young adult male Wistar rat. The long-term exposition to AlCl<sub>3</sub> [3.6 g during 120 days (0.03 g/day)] induced an increase of ~7 ng Al<sup>3+</sup>/mg of protein in the total aluminium concentration of the presynaptic nerve terminals (synaptosomes) isolated from rat brain cortex and induced the inhibition (30%) of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity. The aluminium inhibitory effect on the synaptosomal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity was also observed during *in vitro* assays, and it was dependent on the AlCl<sub>3</sub> concentration in the reaction medium. The *in vivo* and *in vitro* aluminium inhibitory action on (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase reduces the additional activation of membrane-bound (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase by high ATP concentrations, dropping the maximal velocity of the hydrolytic reaction. The inhibitory effect was only observed in the presence of ATP saturating concentrations, and it seems to implicate the reduction of enzyme oligomerization, diminishing the number of interacting protomers within the oligomeric ensemble of the membrane-bound (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. The administration of AlCl<sub>3</sub> (0.03 g/day), during 120 days, inhibited brain and kidney isozymes, without modifying the expression patterns of the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase catalytic subunit ( $\alpha$ ). The aluminium-induced inhibition of all isozymes was demonstrated by the analysis of the enzyme activity in the presence of increasing concentrations of ouabain. By densitometric analysis of immunodetected proteins with antibodies that bind to specific sequences of  $\alpha$ ,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits, no significant changes in protein expression were observed. The *in vivo* and *in vitro* aluminium effects on (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase share the same main characteristics. Conversely, the analysis of membrane fluidity, cholesterol/total phospholipids molar ratio and prooxidant-antioxidant balance in the synaptosomal fraction revealed that the alterations of these parameters upon *in vivo* aluminium exposition are distinct from those observed when aluminium is present in the reaction medium (*in vitro*).

The (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase inhibition seems to occur during the initial phase of the aluminium neurotoxic action, since no evidences of cell death/membrane disruption, reduction of energy and alteration of transmembrane Na<sup>+</sup> gradient in the synaptosomes, isolated from the brain cortex of young adult male Wistar rat, were observed. The ultrastructure of synaptosomes, as well as lactate dehydrogenase leakage, endogenous adenine nucleotides levels, ATP/ADP ratio, energy charge potential and uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid, remained unchanged after oral exposition to 3.6 g of AlCl<sub>3</sub> during 120 days (0.03 g/day).





# Índice

<i>Conteúdo</i>	<i>Página</i>
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>I – Introdução</b>	<b>3</b>
1. <i>O alumínio inibe a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase</i>	5
2. <i>A importância da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase nas células nervosas</i>	8
3. <i>A neurotoxicidade do alumínio</i>	15
4. <i>Objectivos do trabalho</i>	23
<b>II - Materiais e métodos</b>	<b>25</b>
1. <i>Manutenção dos animais em laboratório</i>	27
2. <i>Testes comportamentais</i>	27
3. <i>Preparação do material biológico</i>	28
3.1. <i>Homogeneização dos tecidos</i>	28
3.2. <i>Isolamento da fracção sinaptossomal</i>	29
4. <i>Determinação da concentração de proteína</i>	30
5. <i>Quantificação do alumínio</i>	30
6. <i>Caracterização morfológica da fracção sinaptossomal</i>	31
7. <i>Determinação da libertação da lactato desidrogenase</i>	32
8. <i>Quantificação dos nucleótidos de adenina endógenos</i>	33
9. <i>Determinação da fluidez de membrana</i>	34
10. <i>Determinação da acumulação de ácido γ-aminobutírico</i>	35
11. <i>Determinação da actividade da ATPase</i>	36
12. <i>Quantificação de lípidos</i>	38
13. <i>Determinação de grupos carbonilo</i>	39
14. <i>Determinação de grupos sulfidrilo</i>	40
15. <i>Avaliação da presença de isoformas da subunidade α da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase</i>	41
16. <i>Análise estatística dos dados</i>	43

<b>III – Resultados</b>	<b>45</b>
<b>1. Caracterização do modelo experimental</b>	<b>47</b>
1.1. Protocolo de administração de alumínio	48
1.2. Avaliação da absorção e eliminação da dose de alumínio	48
1.3. Avaliação do peso corporal	56
1.4. Avaliação do comportamento	57
1.5. Acumulação de alumínio nos terminais nervosos	61
1.6. Caracterização ultra-estrutural dos sinaptossomas	64
1.7. Integridade da membrana plasmática dos sinaptossomas	64
1.8. Fluidez da membrana plasmática dos sinaptossomas	66
1.9. Nucleótidos de adenina nos sinaptossomas	68
1.10. Balanço prooxidante-antioxidante nos sinaptossomas	69
1.11. Actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal	71
1.12. Acumulação do ácido $\gamma$ -aminobutírico pelos sinaptossomas	73
<b>2. Efeito do alumínio na fluidez da membrana pré-sináptica</b>	<b>75</b>
2.1. Protocolo de administração oral de alumínio e colestipol	75
2.2. Efeito do colesterol na acumulação de alumínio dos terminais nervosos após administração oral de alumínio	76
2.3. Efeito do colesterol nas alterações de fluidez de membrana dos terminais nervosos induzidas por alumínio após administração oral de alumínio	79
<b>3. Efeito do alumínio na actividade da <math>(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}</math> sinaptossomal</b>	<b>85</b>
3.1. Efeito da exposição <i>in vitro</i> a alumínio na actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$	86
3.2. Efeito da exposição a alumínio na actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em função da concentração de substrato	90
3.3. Efeito da exposição crónica a alumínio na actividade e expressão de isoenzimas da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$	97

<b>IV – Discussão</b>	<b>107</b>
1. <i>Relevância do modelo experimental e dos parâmetros avaliados para a compreensão do papel da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase na neurotoxicidade do alumínio</i>	110
2. <i>O colesterol modifica a acumulação do alumínio e a alteração da fluidez da membrana pré-sináptica induzida pela exposição a alumínio</i>	119
3. <i>O alumínio reduz a activação adicional da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase por concentrações elevadas de ATP</i>	124
<b>V – Conclusões</b>	<b>139</b>
<b>VI – Bibliografia</b>	<b>147</b>



## Abreviaturas

AACG	espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite
AOAA	ácido amino-oxaloacético
ADP	adenosina-5'-difosfato
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ATPase	adenosinatrifosfatase
CAPS	ácido 3-[ciclohexilamina]-1-propanosulfônico
CH	colesterol
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitro)benzóico
ECP	potencial de carga energética adenínica
EDTA	ácido [etilenodiamino]tetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis[β- amino-(éter etílico)]-N,N'-tetracético
<i>g</i>	aceleração da gravidade
GABA	ácido γ-aminobutírico
GTP	guanosina-5'-trifosfato
[ <sup>3</sup> H]GABA	ácido 4-amino- <i>n</i> [2,3- <sup>3</sup> H]butírico
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanossulfônico]
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
<i>IC</i> <sub>50</sub>	concentração de uma substância que causa 50% de inibição
ICP	espectrometria de emissão com plasma
LDH	lactato desidrogenase
<i>n</i>	número máximo de protómeros que interagem no conjunto oligomérico
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido (forma reduzida)
<i>n</i> <sub>H</sub>	coeficiente de Hill
PL	fosfolípidos

P <sub>i</sub>	fosfato inorgânico
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	1,2- <i>bis</i> [dimetilamino]etano
TMA-DPH	1-(4-(trimetilamino)fenil)-6-fenilhexa-1,3,5-trieno
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UTP	uridina-5'-trifosfato
$V_{máx}$	velocidade máxima de reacção

## I - Introdução

---

## **1. O alumínio inibe a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase**

Os primeiros estudos do efeito do alumínio na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase remontam aos anos 80 do século XX (Lai *et al.*, 1980a; King *et al.*, 1983). Lai e colaboradores (Lai *et al.*, 1980a) constataram que a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase de sinaptossomas isolados a partir do cérebro do rato é mais sensível a AlCl<sub>3</sub> do que a actividade de Mg<sup>2+</sup>-ATPase. Porém, o alumínio foi considerado um inibidor pouco potente relativamente a outros catiões metálicos em solução (Cd<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>), visto serem necessárias concentrações de alumínio 10-1000 vezes superiores para produzir 50% de inibição ( $IC_{50} = 8,3 \text{ mM}$  para Al<sup>3+</sup>). Resultados similares foram obtidos em eritrócitos humanos, não tendo sido possível observar qualquer efeito nas actividades da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e Ca<sup>2+</sup>-ATPase para concentrações de AlCl<sub>3</sub> inferiores a 100 µM (King *et al.*, 1983).

O interesse pelo efeito do alumínio na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase ressurgiu 10 anos mais tarde, em consequência de dois tipos distintos de observações. Por um lado, a demonstração de que o alumínio, em concentrações micromolares, aumenta a capacidade de ligação de alta afinidade de ubaína, um inibidor selectivo da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, dos microvasos isolados a partir do córtex cerebral do rato, sem alterar a afinidade dos locais de ligação (Caspers *et al.*, 1990; 1994). Por outro lado, a exposição *in vivo* a alumínio reduz a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase (Lal *et al.*, 1993; Sarin *et al.*, 1997a). De facto, Lal e colaboradores (Lal *et al.*, 1993) estudaram o efeito do consumo diário de água contendo 500 mg AlCl<sub>3</sub>/l durante 180 dias no cérebro do rato e observaram uma inibição significativa (~26%) da actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. A exposição produziu um aumento significativo do conteúdo em alumínio nas várias regiões cerebrais analisadas, nomeadamente, um aumento de 59% no córtex cerebral ( $1,68 \pm 0,16$  versus  $2,67 \pm 0,20 \text{ µg Al}^{3+}/\text{g}$  de peso seco), bem como deterioração das funções cognitivas. Foi também observado um aumento da peroxidação lipídica (~32%), sugerindo que alterações na estrutura da membrana estariam envolvidas na inibição da actividade da enzima por alumínio (Lal *et al.*, 1993). Num outro estudo realizado com primatas (*Macacca mulatta*) expostos a 25 mg de lactato de alumínio/Kg de peso corporal (ingestão oral mediante a utilização de sonda gástrica, em dias alternados, durante 52 semanas) também foi



observada uma diminuição de 80% da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  cerebral (Sarin *et al.*, 1997a). A exposição a alumínio causou uma acumulação significativa deste metal nas três zonas cerebrais estudadas. Acumulações mais elevadas foram observadas no hipocampo (3,9 vezes) e corpo estriado (3,3 vezes), seguida pelo córtex cerebral (1,9 vezes). Nesta última, os animais controlo apresentavam um conteúdo em alumínio de  $2,23 \pm 0,55 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de tecido e os animais expostos a alumínio  $4,29 \pm 0,41 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de tecido. Sarin e colaboradores observaram ainda que a exposição crónica a alumínio causou uma diminuição significativa do conteúdo em lípidos totais, glicolípidos e fosfolípidos, bem como um aumento dos níveis de colesterol e da razão colesterol/fosfolípidos. Estes investigadores sugeriram que a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  poderia estar relacionada com alterações na composição lipídica e fluidez da membrana plasmática, como consequência da intensificação da peroxidação lipídica (Sarin *et al.*, 1997a).

O estudo comparativo da acção inibitória do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em sinaptossomas, células neuronais e astrócitos, preparados a partir do cérebro do rato e permeabilizados por Triton X-100, revelou que o efeito de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  é mais acentuado ao nível das células neuronais ( $IC_{50} = 15 \mu\text{M}$ ) e astrócitos ( $IC_{50} = 18 \mu\text{M}$ ) do que ao nível da fracção sinaptossomal ( $IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ ), apesar do alumínio interagir preferencialmente com as membranas de origem astrocitária (Rao, 1992). Por outro lado, o  $\text{AlCl}_3$  parece ser mais eficaz a promover a inibição da enzima, pois na presença de  $\text{AlCl}_3$   $30 \mu\text{M}$  já se observa uma redução de 50% da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal (Rao, 1990).

A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por  $\text{AlCl}_3$ , na gama de concentrações micromolares, é caracterizada pela diminuição da velocidade máxima de hidrólise de ATP, não tendo sido observados quaisquer efeitos, quer na constante de dissociação aparente para ATP, quer na activação por  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Caspers *et al.*, 1993; 1994). Por conseguinte, o alumínio parece actuar como inibidor reversível não competitivo da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e, simultaneamente, promover o aumento da capacidade de ligação de alta afinidade de ubaína à enzima (Caspers *et al.*, 1990; 1994), sugerindo que a acção inibitória do alumínio envolve estabilização da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na forma fosforilada (Caspers *et al.*, 1994).

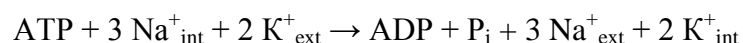
Não obstante Zatta e colaboradores (Zatta *et al.*, 1995) terem observado estimulação por alumínio de actividade hidrolítica de ATP sensível a ubaína na presença de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , os demais estudos relativos ao efeito do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  destacam a sua acção

inibitória nesta actividade enzimática. Há ainda outras evidências da acção inibitória do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal. O transporte activo dos neurotransmissores, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e glutamato, depende do gradiente electroquímico transmembranar de  $\text{Na}^+$  (Simpson & Smart, 1982; Kanner & Schuldiner, 1987) e, conseqüentemente, requer a manutenção deste gradiente pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  membranar. De facto, foi descrito que o alumínio reduz parcialmente a acumulação de GABA e glutamato por sinaptossomas preparados a partir do hipocampo do rato e do coelho (Wong *et al.*, 1981; Sturman *et al.*, 1983). Contudo, o mecanismo molecular de interferência do alumínio com o transporte destes neurotransmissores não é conhecido.

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é inibida por espécies reactivas de oxigénio (Kako *et al.*, 1988; Jamme *et al.*, 1995; Kaplan *et al.*, 1997). A susceptibilidade da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  à peroxidação lipídica é conhecida há décadas (Svoboda *et al.*, 1984). No entanto, o mecanismo de inibição permanece por esclarecer, tendo sido sugeridos pelo menos dois mecanismos independentes. A inibição da enzima devida a alterações na microviscosidade da membrana (Jamme *et al.*, 1995; Stanimirovic *et al.*, 1995) e/ou inibição directa devida à modificação das cadeias polipeptídicas do complexo enzimático por espécies reactivas de oxigénio (Boldyrev & Bulygina, 1997) ou por aldeídos provenientes da peroxidação lipídica (Siems *et al.*, 1996; Mark *et al.*, 1997). Por outro lado, o alumínio é um conhecido prooxidante (Oteiza *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 2004; Yousef, 2004), capaz de alterar a fluidez da membrana plasmática (Weis & Haug, 1989; Van Rensburg *et al.*, 1992; Ohba *et al.*, 1994; Pandya *et al.*, 2001; Verstraeten *et al.*, 2002; Bazzoni *et al.*, 2005). De facto, os sais de alumínio não induzem por si só peroxidação lipídica, mas aceleram a induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , especialmente a pH ácido (Xie & Yokel, 1996). A presença de alumínio durante o tratamento de eritrócitos humanos com peróxido de hidrogénio a pH 7,4 acelera a peroxidação lipídica (Gutteridge *et al.*, 1985). Este metal produz ainda alterações na estrutura membranar, facilitando assim a progressão da peroxidação lipídica (Gutteridge *et al.*, 1985; Xie & Yokel, 1996; Yousef, 2004). Apesar dos estudos já efectuados, o mecanismo de acção do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  permanece por explicar.

## 2. A importância da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ nas células nervosas

Em 1957, Jens C. Skou descobriu a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (EC 3.6.3.9) e propôs o seu papel na extrusão activa de  $\text{Na}^+$  da célula nervosa (Skou, 1957). Depressa se reuniram evidências no sentido de demonstrar que esta enzima constitui a maquinaria molecular, que usa a energia proveniente da hidrólise de ATP para o transporte activo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (bomba de sódio e potássio) através da membrana plasmática nas células animais (Skou, 1965). Nas décadas seguintes, foi realizado um trabalho extenso sobre a estrutura e função da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Esta enzima membranar catalisa a hidrólise de ATP e conjuga a transferência de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana contra o gradiente electroquímico, de acordo com a seguinte equação:



A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , uma bomba catiónica da membrana plasmática, ubíqua nas células animais, é essencial para muitas funções celulares básicas e especializadas dos tecidos. O transporte activo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é de grande significado fisiológico. Cerca de um terço do ATP consumido por um animal em repouso é usado para bombear estes iões (Jorgensen *et al.*, 2003). Os gradientes electroquímicos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  são importantes para o controlo do volume celular, transporte de metabolitos e outras substâncias e para assegurar a excitabilidade das células nervosas e musculares (Mobasheri *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2003). Por conseguinte, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , ao controlar as concentrações de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Na}^+$  no interior das células, participa activamente na manutenção destes gradientes iónicos.

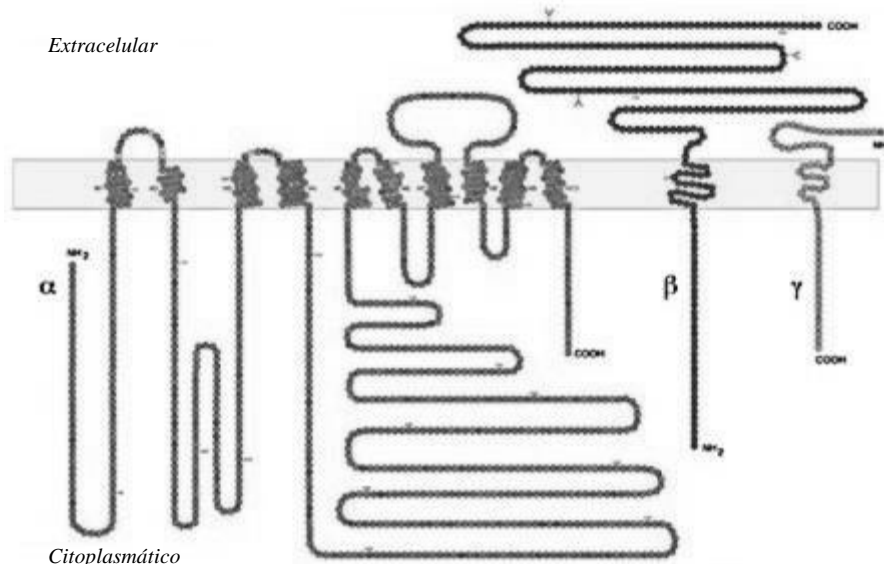
A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é composta por duas subunidades polipeptídicas obrigatórias, a subunidade catalítica  $\alpha$  (cuja massa molecular é  $\sim 112$  kDa) e a subunidade glicoproteica reguladora  $\beta$  (cuja massa molecular varia entre 40 e 60 kDa de acordo com a extensão da glicosilação) (McDonough *et al.*, 1990). Possui ainda uma terceira componente não obrigatória, a subunidade  $\gamma$  (cuja massa molecular é  $\sim 7,4$  kDa), de natureza proteolipídica e pertence à família FXYD, que compreende os reguladores do transporte de iões de pequenas dimensões (Mercer *et al.*, 1993; Arystarkhova *et al.*, 1999).

O modelo topológico da enzima é ainda controverso (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Shainskaya & Karlish, 1994; Mohraz *et al.*, 1994). Contudo, está estabelecido que a subunidade  $\alpha$  é transmembranar e contém os locais de ligação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP e

glicosídeos cardíacos, uma classe de compostos naturais, que engloba inibidores específicos da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Therien & Blostein, 2000; Scheiner-Bobis, 2002). A subunidade  $\alpha$  possui dez segmentos transmembranares. Grande parte da cadeia  $\alpha$ , incluindo o centro catalítico, forma o domínio citoplasmático entre o quarto e o quinto segmento transmembranar. Apesar dos glicosídeos cardíacos serem amplamente usados como inibidores da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , o mecanismo de acção e a localização dos locais de ligação não são completamente conhecidos. Provavelmente, estes compostos ligam-se à primeira e quinta ansas extracelulares (Keenan *et al.*, 2005), exercendo o seu efeito sem necessitarem de atravessar a membrana plasmática. Porém, numerosos estudos revelaram o envolvimento de vários resíduos de aminoácidos situados ao nível doutros domínios extracelulares, bem como ao nível de segmentos transmembranares.

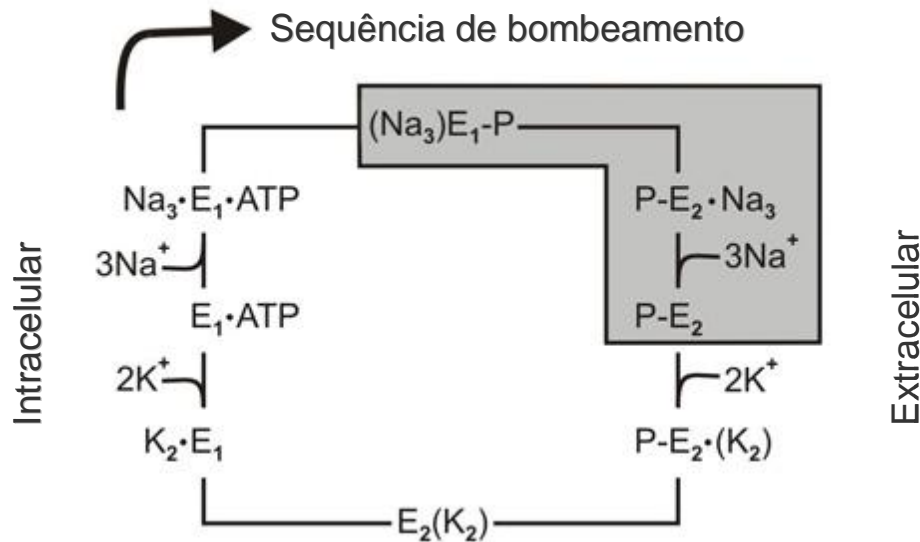
Em contrapartida, a maior parte da subunidade  $\beta$  está exposta ao exterior da célula (Arystarkhova *et al.*, 1995). A subunidade  $\beta$  é frequentemente referida como a subunidade reguladora, apesar da actividade enzimática requerer a sua presença no protómero heterodimérico, responsável pela reacção hidrolítica e translocação de iões (Brotherus *et al.*, 1983; Fambrough *et al.*, 1994). Tal como a subunidade  $\beta$ , a subunidade  $\gamma$  atravessa a membrana plasmática. No entanto, o seu terminal amino é extracelular (Mercer *et al.*, 1993; Béguin *et al.*, 1997; Therien *et al.*, 2001). Esta subunidade existe, provavelmente, em quantidade semelhante às subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  nos tecidos onde é expressa (Mobasheri *et al.*, 2000).

O esquema seguinte, proposto por Blanco (2003/04), ilustra a topologia de cada uma das subunidades da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura I.1).



**Figura I.1. Esquema da topologia das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (adaptado de Blanco (2003/04)).**

O mecanismo de reacção envolve a transição entre dois estados conformacionais fundamentais da enzima, denominados  $E_1$  e  $E_2$ . As duas conformações estabelecem interacções distintas com o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP e ubaína e diferem na exposição dos locais de ligação de iões aos espaços intra- e extracelulares. No primeiro passo da sequência de reacção, quando o  $\text{Na}^+$  se liga aos locais expostos à face extracelular, a enzima hidrolisa ATP com elevada afinidade, ocorrendo fosforilação num resíduo de aspartato, situado no domínio intracelular central, e consequente formação de  $(\text{Na}_3)\text{E}_1\text{-P}$ . Após oclusão dos três iões  $\text{Na}^+$ , ocorre a transição para a conformação  $\text{P-E}_2\text{Na}_3$  e exposição dos locais de ligação de  $\text{Na}^+$  ao espaço extracelular. Durante esta fase, a afinidade para  $\text{Na}^+$  diminui, enquanto que aumenta a afinidade dos locais de ligação de  $\text{K}^+$ . Assim, três iões de  $\text{Na}^+$  são extruídos e o  $\text{K}^+$  extracelular liga-se à enzima ( $\text{P-E}_2(\text{K}_2)$ ). A ligação do  $\text{K}^+$  à enzima induz desfosforilação espontânea ( $\text{E}_2(\text{K}_2)$ ), seguida por oclusão dos dois iões  $\text{K}^+$  e consequente translocação para o interior da célula. A presença de ATP intracelular facilita a libertação de  $\text{K}^+$ , favorecendo a transição para a conformação  $\text{E}_1$ . Na sua globalidade, o ciclo catalítico da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pode ser representado pelo esquema proposto por Albers-Post (Geibel *et al.*, 2003) e apresentado na Figura I.2.



**Figura I.2.** O ciclo de reacção da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  segundo Albers-Post (adaptado de Geibel *et al.*, 2003).

Todas as ATPases do tipo *P* funcionam de forma similar: oclusão de iões durante o processo de translocação, para a qual obtêm energia através da hidrólise de ATP associada à formação e ruptura da ligação covalente do grupo fosfato à enzima e transição conformacional. O modelo descrito, não tem em consideração que a bomba de sódio e potássio pode existir como um oligómero de subunidades cooperantes  $(\alpha\beta)_n$  e conter vários locais de ligação de ATP (Boldyrev, 2001; Kaplan, 2002).

A dependência da velocidade de hidrólise de ATP catalisada pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP tem sido objecto de estudo e a sua interpretação controversa. O efeito da concentração de ATP é bifásico, sugerindo a existência simultânea de locais de ligação com afinidades diferentes e/ou a alteração da sua afinidade durante o ciclo catalítico. Está bem documentado que cada protómero  $\alpha\beta$  possui um local de ligação de ATP, cuja afinidade varia de elevada para baixa com a transição entre a conformação  $\text{E}_1$  e  $\text{E}_2$  da enzima, pois a estequiometria da ligação à subunidade catalítica de ATP, fosfato e ubaína é 1:1:1 e a enzima solubilizada mantém a sua actividade catalítica (Vilsen *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 2000). A natureza bifásica da curva da dependência da actividade hidrolítica em função da concentração de ATP pode ser interpretada como o resultado da existência de cooperatividade entre os locais de ligação de ATP presentes em subunidades

catalíticas distintas (Repke & Schoen, 1973). Na presença de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , durante o processo de translocação iónica, os estados conformacionais,  $E_1$  e  $E_2$ , podem exibir, simultaneamente, locais de elevada e baixa afinidade para o ATP (Plesner *et al.*, 1981). Tal como anteriormente referido, o protómero  $\alpha\beta$  catalisa todas as reacções parciais envolvidas na hidrólise de ATP pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , enquanto que o modelo proposto por Repke e Plesner pressupõe a presença de dois locais de ligação em cada entidade funcional da enzima. De facto, estudos cinéticos demonstraram que o acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte iónico requer a existência de, pelo menos, diprotómeros  $(\alpha\beta)_2$  (Askari & Huang, 1982). Por outro lado, a análise cristalográfica revelou que a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  cristaliza de forma a permitir um contacto estreito entre os protómeros  $\alpha\beta$  (Skrive *et al.*, 1989). Alternativamente, foi sugerida a existências de dois locais de ligação de ATP por cada subunidade  $\alpha$  (Ward & Cavieres, 1993). Nos últimos anos, têm sido reunidas cada vez mais evidências experimentais que apontam para a formação de estruturas oligoméricas,  $(\alpha\beta)_n$ , em condições fisiológicas. Na presença de potássio, o agregado  $\alpha\beta$  forma dímeros e oligómeros mais elevados (até octâmeros) (Maunsbach *et al.*, 1991). Vários estudos demonstraram que a enzima possui a capacidade de formar complexos supramoleculares, quando inserida na membrana plasmática (Boldyrev, 2001; Taniguchi *et al.*, 2001; Lopina, 2001; Kaplan, 2002). Estudos cinéticos permitiram comparar as propriedades da enzima quando opera como um complexo oligomérico ou como protómeros independentes (Hansen *et al.*, 1979; Boldyrev *et al.*, 1981; 1991). Na forma protomérica, a activação da reacção hidrolítica por ATP parece ser condicionada pela existência de cooperatividade negativa na ligação de alta afinidade de ATP, enquanto que na forma oligomérica acresce referir a ocorrência de activação adicional por altas concentrações de ATP, envolvendo a ligação de ATP a locais de baixa afinidade. O tratamento da enzima com detergente permitiu observar que esta deixa de apresentar cooperatividade positiva para o substrato, em consequência da perturbação das interacções inter-protoméricas (Boldyrev *et al.*, 1981). Adicionalmente, foi demonstrado que a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é sensível a factores que afectam o empacotamento da bicamada lipídica na membrana e modificam a microviscosidade da membrana celular *in situ* (Kimmelberg & Papahadjopoulos, 1972; Silvius & McEhhaney, 1982).

Shull e colaboradores (1986) clonaram três formas distintas da subunidade  $\alpha$ , agora designadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ . Hoje é aceite que múltiplos genes codificam a subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Shull & Lingrel, 1987; Lingrel *et al.*, 1990; Shamraj & Lingrel, 1994). Três isoformas diferentes da subunidade catalítica  $\alpha$  foram identificadas ao nível genético (Shull *et al.*, 1986b; Kent *et al.*, 1987) e protéico usando técnicas imunológicas (Felsenfeld & Sweadner, 1988; Shyjan & Levenson, 1989; Sweadner, 1989; Urayama *et al.*, 1989). Uma quarta isoforma da subunidade  $\alpha$  foi identificada em testículo do rato e do homem (Shamraj & Lingrel, 1994). As isoformas  $\alpha$  têm propriedades cinéticas distintas, que foram extensivamente estudadas por Lingrel e colaboradores (Jewell & Lingrel, 1991). Estes autores compararam a dependência de substrato da actividade hidrolítica das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de rato expressas em células HeLa e demonstraram que a afinidade da isoforma  $\alpha_3$  para  $\text{Na}^+$  é 2 a 3 vezes inferior à exibida pelas isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , mas a isoforma  $\alpha_3$  tem uma afinidade para ATP ligeiramente superior. Também relativamente à ubaína, as diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  apresentam sensibilidades distintas. No rato, por exemplo,  $\alpha_1$  é 100 vezes mais resistente à ubaína do que  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  (Sweadner, 1979; 1985). Usando uma preparação parcialmente purificada a partir do cérebro do rato, foram identificaram três “populações” de actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  com diferentes sensibilidades a ubaína, possivelmente correspondendo à presença das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1990). De facto, isoenzimas diferentes possuem diferente sensibilidade a ubaína, assim a  $\alpha_3\beta_1$  e a  $\alpha_3\beta_2$  apresentam elevada sensibilidade a esteróides cardiotónicos, a  $\alpha_2\beta_1$  e a  $\alpha_2\beta_2$  sensibilidade intermédia e a  $\alpha_1\beta_1$  e a  $\alpha_1\beta_2$  sensibilidade baixa (O’Brien *et al.*, 1994). É interessante notar que a  $\alpha_1\beta_1$  do rato expressa em células de insecto é 2 vezes mais sensível e a  $\alpha_3\beta_1$  é 20 vezes menos sensível à ubaína que a enzima nativa. Supõe-se que a diferença na sensibilidade entre a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  nativa e a expressa em células de insecto seja devida ao ambiente lipídico, à presença da subunidade  $\gamma$  ou à estrutura oligomérica da enzima (Blanco & Mercer, 1998).

A nível molecular foram identificadas três isoformas da subunidade reguladora  $\beta$  (Kawakami *et al.*, 1986; Martin-Vasallo *et al.*, 1989; Malik *et al.*, 1996; Arystarkhova & Sweadner, 1997; Serluca *et al.*, 2001). Esta subunidade é importante para a biogénese do



complexo enzimático e uma das suas isoformas ( $\beta_2$ ) desempenha um papel importante na adesão durante o desenvolvimento no sistema nervoso central (Mobasheri *et al.*, 2000).

Até agora foram identificadas em mamíferos 4 isoformas da subunidade  $\alpha$ , 3 isoformas da subunidades  $\beta$  e não são conhecidas isoformas da subunidade  $\gamma$  (Martin-Vassallo *et al.*, 1989; Mercer *et al.*, 1993; Shamraj & Lingrel, 1994; Malik *et al.*, 1996). A isoforma  $\alpha_1$  é a mais abundante e ubíqua na sua distribuição celular. A expressão das restantes isoformas parece mais específica e restrita a determinados tecidos. A isoforma  $\alpha_2$  é expressa com mais abundância no músculo cardíaco, no tecido adiposo e nas células da glia (Sweadner *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1997). A expressão da isoforma  $\alpha_2$  parece ser sensível à insulina (Russo & Sweadner, 1993). A isoforma  $\alpha_3$  é encontrada em concentrações elevadas nos neurónios do sistema nervoso central (Peng *et al.*, 1997) e no músculo cardíaco (Jewell *et al.*, 1992; Sweadner *et al.*, 1994). Adicionalmente, esta isoforma é expressa em baixas quantidades no ovário (Pathak *et al.*, 1994), cartilagem (Mobasheri *et al.*, 1997a, b) e osso (Mobasheri *et al.*, 1996). A isoforma  $\alpha_4$  parece ser testicular (Shamraj & Lingrel, 1994).

O ajustamento da expressão da enzima ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase e da sua actividade a alterações fisiológicas é assegurada por uma variedade de mecanismos de regulação, que englobam rápidas modificações pós-translacionais e alterações do complexo perfil celular de isoenzimas (Blanco & Mercer, 1998; Mobasheri *et al.*, 2000; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Cornelius & Mahmoud, 2003; Jorgensen *et al.*, 2003). Por exemplo, em neurónios onde estão presentes três isoformas da subunidade  $\alpha$ , durante as condições de repouso os gradientes iónicos basais são principalmente mantidos por isoenzimas contendo as subunidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , enquanto que durante a despolarização e o repetido disparo de potenciais de acção, estas isoenzimas funcionam em regime de saturação e a activação máxima da  $\alpha_3$  assegura a restauração do potencial de repouso.

As isoenzimas da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase exibem heterogeneidade estrutural e um padrão complexo de expressão, que é estritamente regulado, permitindo que a actividade da enzima seja ajustada de acordo com as necessidades da célula tanto em condições fisiológicas como patológicas (Sweadner, 1992; Blanco & Mercer, 1998; Mobasheri *et al.*, 2000; Therien & Blostein, 2000; Geering, 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan, 2002; Cornelius & Mahmoud, 2003; Jorgensen *et al.*, 2003). A oligomerização das

unidades funcionais protoméricas da enzima membranaar garante a elevada sensibilidade da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  a alterações na microviscosidade do ambiente lipídico, a espécies reactivas de oxigénio e a outras moléculas de sinalização (Lopina, 2000; Boldyrev, 2001).

### **3. A neurotoxicidade do alumínio**

Apesar do alumínio ser o metal mais abundante da crosta terrestre e o terceiro elemento mais comum, nunca lhe foi atribuída qualquer função nos processos celulares. Toda a sua utilidade para o Homem parece estar associada ao seu uso. O alumínio é um metal, que devido às suas propriedades (baixa densidade, bom condutor de calor e electricidade, reactividade elevada com oxigénio à superfície impedindo a corrosão) e ao seu preço, desde logo interessa a indústria, sendo utilizado em larga escala. É por esse motivo que as sociedades recorrem, cada vez mais, à utilização do alumínio (Bokovay, 1988). Os aditivos alimentares são geralmente a maior fonte de alumínio na dieta (Greger *et al.*, 1994; Glynn *et al.*, 1995). Porém, o recurso a ligas de alumínio para o fabrico de embalagens e de utensílios de cozinha também contribuem para a presença deste metal nos alimentos ingeridos. A própria água potável constitui uma fonte de alumínio, pois o sulfato de alumínio é frequentemente utilizado como coagulante durante o seu tratamento. Este tratamento eleva frequentemente os níveis de alumínio na água da rede pública para além do limite de tolerância humano (Miller *et al.*, 1984; Driscoll & Schecher, 1988; Domingo *et al.*, 1993; Greger, 1993; Greger & Sutherland, 1997). A própria indústria farmacêutica utiliza sais de alumínio como incipiente em medicamentos de uso comum, por vezes em tratamento prolongado, tais como antiácidos e analgésicos (Graves *et al.*, 1990; Flaten *et al.*, 1991; Soares & Gershon, 1994; Fasman *et al.*, 1995). Estima-se que as doses diárias ingeridas, devido ao uso destes medicamentos, sejam respectivamente de 840-5.000 mg e 126-728 mg de alumínio (Lione, 1985).

O alumínio é aceite como sendo um agente neurotóxico (Bolla *et al.*, 1992; Yokel, 2000), implicado na etiopatogénese de doenças neurodegenerativas tais como a Doença de Alzheimer e a encefalopatia de diálise (McDermott *et al.*, 1978; Flaten *et al.*, 1991;

McLachlan *et al.*, 1991b; Meiri *et al.*, 1993; Mjöberg *et al.*, 1997; Exley, 1999; Exley & Korchazhkina, 2001; Flaten, 2001). As primeiras preocupações com a utilização do alumínio surgiram em 1897, quando Dolken injectou tartarato de alumínio em coelhos e observou degenerescência neuronal em determinadas zonas cerebrais. Em 1921, Seibert e Wells observaram alterações no sistema nervoso central após administração sistémica do alumínio, admitindo-se desde então o seu presumível papel neurotóxico (Kerr & Ward, 1988). No entanto, mais de um século após as primeiras evidências de neurotoxicidade do alumínio, ainda muito pouco se sabe acerca do seu mecanismo de acção neurotóxica e das concentrações a partir das quais a referida acção neurotóxica se desencadeia. A título indicativo, foi sugerido que o conteúdo em alumínio do cérebro humano é 15 - 30  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso seco, e que em casos de intoxicação por alumínio estes níveis podem aumentar 3 a 10 vezes (Ganrot, 1986).

O povo Chamorro, que vive na ilha de Guam no oceano Pacífico, apresenta uma elevada incidência de doenças neurodegenerativas, caracterizadas por parkinsonismo, demência e esclerose lateral amiotrófica. Provavelmente, a ingestão de água pobre em  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e simultaneamente rica em  $\text{Al}^{3+}$ , a presença de toxinas (L-BMAA e BMAA) na alimentação e uma predisposição genética constituem as causas da doença neurodegenerativa de Guam (Oyanagi, 2005). A deficiência em cálcio e magnésio induz hiperparatiroidismo secundário e consequente acumulação de alumínio e manganésio no sistema nervoso central (Wills & Savory, 1988; Meiri *et al.*, 1993). De facto, em testes efectuados no macaco verificou-se que as dietas pobres em  $\text{Ca}^{2+}$  e ricas em  $\text{Al}^{3+}$  induzem lesões neurológicas caracterizadas por acumulação de neurofilamentos fosforilados (Garruto *et al.*, 1989). Adicionalmente, testes efectuados em ratinho mostraram perda de células nervosas após consumo prolongado de ração com elevado teor em  $\text{Al}^{3+}$  e reduzido teor de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Kihira *et al.*, 2002).

O papel patogénico do alumínio na Doença de Alzheimer está ainda por definir, sendo bastante controverso (Wills & Savory, 1988; McLachlan *et al.*, 1991b; Meiri *et al.*, 1993; Exley, 1999; Zatta *et al.*, 2003; Oteiza *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005). Vários investigadores observaram o aumento da concentração de alumínio em amostras de cérebro, tranças neurofibrilares e placas senis, lesões neuropatológicas características da

Doença de Alzheimer (Perl *et al.*, 1982; Good *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994; McLachlan, 1995; Savory *et al.*, 1996; Beauchemin & Kisilevsky, 1998).

Nos últimos anos, têm surgido numerosas evidências que sugerem a participação do alumínio na acção neurotóxica do peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) (Clauberg & Joshi, 1993; Kuroda *et al.*, 1995; Bondy *et al.*, 1998a; Campbell *et al.*, 2000; Exley & Korchazhkina, 2001), o principal componente das placas senis características da Doença de Alzheimer. Recentemente, foi proposto que a interacção tanto da proteína precursora amilóide como de A $\beta$  com sistemas de transporte iónico representam os passos iniciais da alteração na função neuronal, precedendo a formação das placas (Mark *et al.*, 1997; Lauderback *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 1999; Kourie, 2001). A A $\beta$  1-40, em concentrações na ordem dos nanomolar, inibe selectivamente a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase em fatias e culturas primárias do hipocampo do rato (Bores *et al.*, 1998). Foi demonstrado que a exposição de neurónios do hipocampo do rato em cultura, a A $\beta$  1-40 ou 25-35 causa a redução selectiva na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, que precede a perda da homeostasia do cálcio e a degenerescência celular (duas características comuns à Doença de Alzheimer e à intoxicação por alumínio) (Mark *et al.*, 1995).

Por outro lado, Lynch e Mobley propuseram que a Doença de Alzheimer é causada por alterações na influxo e/ou metabolismo do colesterol celular, que resulta na disfunção do tráfego de proteínas críticas para o funcionamento e viabilidade neuronal (Lynch & Mobley, 2000). De facto, a reciclagem anormal do colesterol no cérebro parece estar associada a processos neurodegenerativos (Bogdanovic *et al.*, 2001), e, durante os últimos anos, tem sido sugerido que o colesterol possui um papel importante na patogénese de doenças neurodegenerativas (Farkas *et al.*, 2000; Atkinson 2001; Cucchiara & Kasner, 2001; Hartmann, 2001; Joseph *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 2001). Estes estudos indicam que a hipercolesterolemia induzida pela dieta aumenta a acumulação intraneuronal e deposição no cérebro da proteína  $\beta$ -amilóide, que desempenha um papel fulcral na Doença de Alzheimer (Sparks *et al.*, 1994; 1995; Refolo *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001); elevados níveis de colesterol no soro e genótipo de apolipoproteína E constituem um factor de risco para a Doença de Alzheimer (Kuo *et al.*, 1998; Notkola *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999); e ocorre redução de risco de demência em pacientes tratados com inibidores da biossíntese de colesterol (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000). Além disso,

descobertas recentes destacaram o impacto directo do colesterol no processamento da proteína precursora da  $\beta$ -amilóide, na toxicidade da proteína  $\beta$ -amilóide e na formação de fibras amilóides ao nível dos “rafts” membranares ricos em colesterol (Mizuno *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000; Chochina *et al.*, 2001; Kakio *et al.*, 2001; Riddell *et al.*, 2001). Por outro lado, durante o envelhecimento ocorre alteração dos níveis de colesterol das membranas sinápticas (Igbavboa, 1996) e a vulnerabilidade a intoxicações por alumínio parece aumentar (Savory *et al.*, 1999). É interessante notar que, a proteína precursora da  $\beta$ -amilóide contém a sequência considerada como “motivo ligante de caveolina” (Ikezu *et al.*, 1998), uma proteína presente em “rafts” lipoproteicos das células neuronais (Galbiati *et al.*, 1998; Braun & Madison, 2000). A combinação lipídica singular dos domínios membranares ricos em colesterol e caveolina, permite a constituição de “rafts” lipoproteicos especializados em funções tais como o transporte iónico e de metabolitos e a sinalização celular (Harder & Simons, 1997; Brown & London, 1998; Masserini *et al.*, 1999; Brown & London, 2000; Simons & Ikonen, 2000; Suzuki & Sheetz, 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que o hidróxido de alumínio contido nos antiácidos e outros complexos de alumínio produzem hipercolesterolemia (Nagyvary & Bradbury, 1977; Sperber *et al.*, 1991).

Estudos realizados em animais contribuíram para esclarecer muitos dos aspectos da Doença de Alzheimer, ao mostrarem que algumas das lesões características desta doença podem ser reproduzidas por administração de alumínio, desde que sejam usados compostos de alumínio adequados e as vias de exposição e doses administradas sejam eficazes (Huang *et al.*, 1997; McLachlan, 1995; Savory *et al.*, 1996; 1999). Por outro lado, um estudo mostrou que o tratamento com desferroxamina, um quelante de iões trivalentes usado para tratar intoxicações por ferro e alumínio, pode diminuir/retardar a progressão clínica da Doença de Alzheimer (McLachlan *et al.*, 1991a). Adicionalmente vários estudos epidemiológicos indicam a existência de uma relação entre o conteúdo em alumínio da água potável e a incidência da Doença de Alzheimer (Jansson, 2001; Flaten, 2001; Rondeau, 2002).

Na encefalopatia de diálise, em que ocorre demência, o alumínio exerce acções neurotóxicas comprovadas. O desenvolvimento deste síndrome nos pacientes com insuficiência renal está associado à exposição a níveis excessivos de alumínio existente na

água de hemodiálise e nos tampões de fosfato, pois elevados níveis de alumínio foram encontrados no cérebro e soro destes pacientes (Wills & Savory, 1988; Meiri *et al.*, 1993; Neiva *et al.*, 2002; Wolff *et al.*, 2002). Em Abril de 1993, 140 insuficientes renais, que faziam hemodiálise no Hospital Distrital de Évora, foram intoxicados por alumínio. Os doentes intoxicados com níveis de alumínio no sangue da ordem dos 173 µg/l apresentaram alucinações e convulsões seguidas de coma e morte. Posteriormente, verificou-se que em resultado de falhas nos sistemas de osmose inversa e de purificação da água da rede pública, os índices de alumínio na água utilizada para a hemodiálise eram extremamente elevados (435 mg/l) (Inácio, 1993). Apesar do número de episódios de intoxicação com alumínio dos dialisados ter diminuído ao longo das últimas duas décadas, o alumínio continua a ser o maior agente causador de osteomalácia em indivíduos com insuficiência renal (Cannata Andía, 2000). Actualmente, manter os níveis óptimos de colesterol sanguíneo constitui uma recomendação como forma de prevenir a demência vascular relacionada com o envelhecimento de pacientes que se submetem a diálise durante longos períodos de tempo, que está sempre associada a elevados níveis de alumínio no sangue (Rob *et al.*, 2001).

Há uma preocupação crescente acerca dos efeitos adversos do alumínio no desenvolvimento de alterações de comportamento (Golub & Domingo, 1996). Animais expostos a alumínio apresentam dificuldades de aprendizagem e défice de memória (Petit *et al.*, 1980; Rabe *et al.*, 1982; Yokel, 1983; Pendlebury, 1988; Lal *et al.*, 1993; Yokel *et al.*, 1994; Julka *et al.*, 1995; Miu *et al.*, 2003). Estas alterações foram observadas em gatos (Crapper & Dalton, 1973a, b), ratos (Lipman *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1988; Lal *et al.*, 1993; Julka *et al.*, 1995) e coelhos (Petit *et al.*, 1980; Rabe *et al.*, 1982; Petit *et al.*, 1985; Yokel *et al.*, 1994). Porém, a utilização de protocolos de exposição bem distintos e um número reduzido de testes comportamentais não possibilita a caracterização das alterações comportamentais induzidas por alumínio.

Decorrido um século após as primeiras evidências de que o alumínio induz neurodegenerescência, ainda pouco se pode afirmar acerca dos seus mecanismos de acção. Consequentemente, a investigação dos mecanismos celulares de neurotoxicidade é extremamente importante na avaliação de risco ocupacional e ambiental de determinados grupos de indivíduos. Alguns relatórios clínicos demonstraram um aumento da absorção do

alumínio durante o envelhecimento e certas patologias, conduzindo à acumulação do alumínio no organismo (McDermott *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1998). Uma vez que o alumínio pode atravessar a barreira hematoencefálica (Ackley & Yokel, 1997; Yokel *et al.*, 1999), a sua acumulação representa um aumento do risco neurotoxicológico.

Diversos efeitos adversos do alumínio no cérebro parecem envolver uma inibição das vias de transdução de sinal (Haug *et al.*, 1994; Shafer & Mundy, 1995; Exley 1999; Yokel, 2000), mas os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade do alumínio no cérebro permanecem pouco esclarecidos. Além disso, vários investigadores sugerem que o alumínio tem um efeito bifásico (qualitativamente diferente de acordo com a concentração) na neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica (Julka *et al.*, 1995; Sarin *et al.*, 1997b; Cucarella *et al.*, 1998; Kumar, 1998).

O sistema colinérgico aparece associado à neurotoxicidade do alumínio desde os primeiros trabalhos realizados. Em vários estudos investigou-se o efeito do alumínio na actividade da acetilcolinesterase *in vitro* e *in vivo*. No entanto os resultados obtidos são bastante contraditórios. Alguns autores descreveram uma diminuição da actividade da acetilcolinesterase na presença de alumínio, enquanto outros descreveram uma activação (Marquis & Black, 1984; Sharp & Roseberry, 1985; Gulya *et al.*, 1990; Peng *et al.*, 1992; Zatta *et al.*, 1994; Kumar, 1998; Sarkarati *et al.*, 1999; Szutowicz, 2001; Dave *et al.*, 2002). Todos os componentes deste sistema parecem modificados pela presença do alumínio. O transportador de colina, responsável pela sua recaptura para o interior do terminal pré-sináptico, é inibido (Julka *et al.*, 1995) e a actividade da acetilcolintransferase diminui, contribuindo ambos os efeitos para a redução dos níveis de acetilcolina pré-sinápticos. Por outro lado, a nível pós-sináptico verifica-se a redução da densidade de distribuição dos receptores muscarínicos sem alteração da sua afinidade (Julka *et al.*, 1995). A competição entre o  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  pelos seus locais de ligação intra- e extracelulares (Harris, 1992; Xie *et al.*, 1996), tem sido envolvida no mecanismo de alteração do sistema colinérgico por alumínio. O alumínio extracelular inibe o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para os neurónios, o que compromete o transporte de acetil-coenzima A da mitocôndria para o citoplasma dos terminais nervosos, podendo conduzir à supressão da síntese e libertação da acetilcolina (Bielarczyk *et al.*, 1998). Presentemente, não existe qualquer evidência experimental que demonstre claramente uma interacção específica do

alumínio com qualquer um dos intervenientes moleculares do sistema colinérgico. Além do mais, diversos efeitos têm sido observados ao nível de outros neurotransmissores (Albrecht *et al.*, 1991; Nayak & Chatterjee, 2001; 2003; El-Rahman, 2003).

O efeito do alumínio no metabolismo da glicose pode contribuir para a redução generalizada das funções neuronais, tal como sugerido inicialmente por Meiri (Meiri *et al.*, 1993; Nayak & Chatterjee, 1999). De facto, o influxo de glicose e a sua utilização no cérebro do rato estão diminuídos após injeção intracerebral ou intraperitoneal de tartarato de alumínio (Lipman & Tolchard, 1989). O consumo, durante 1 ano, de água contendo  $\text{AlCl}_3$  100  $\mu\text{M}$  provoca a redução da actividade da hexocinase e da desidrogenase de glicose-6-fosfato no cérebro do rato (Cho & Joshi, 1988). Foi também demonstrado que tanto a hexocinase citosólica como a mitocondrial, isoladas a partir de tecido cerebral, são inibidas pelo alumínio (Lai & Blas, 1984). O alumínio parece ser um inibidor efectivo da glicólise através da inibição da hexocinase. No entanto, exerce um efeito estimulatório na actividade da piruvato cinase (Lai & Blas, 1984), enquanto elevadas concentrações de alumínio inibem a lactato desidrogenase (Lai & Blas, 1984). Inicialmente, foi proposto que a formação do complexo Al-ATP estaria na origem da inibição da actividade de hexocinase (Womale & Colowick, 1979). Cho e Joshi (1988) demonstraram, posteriormente, que a inibição da hexocinase, produzida por administração de alumínio *in vivo*, não é passível de reversão por diálise do tecido cerebral, o que parece indicar um mecanismo de acção mais complexo. Curiosamente, os mesmos investigadores observaram que durante o processo de diálise a actividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, inicialmente inibida, é totalmente recuperada.

Recentemente, tem sido explorada a acção do alumínio na transcrição genética no cérebro. Foi observada a presença de alumínio no núcleo, ao nível da cromatina, e parece possível o estabelecimento de interacções muito fortes entre  $\text{Al}^{3+}$  e ADN (Wu *et al.*, 2005). Além disso, a presença de alumínio, em concentrações nanomolares, inibe a ARN polimerase II cerebral, indicando que o alumínio pode interromper a síntese de péptidos (Lukiw *et al.*, 1998). Porém, há poucas indicações acerca da relação entre a deterioração genética induzida pelo alumínio e o aparecimento de sinais de neurotoxicidade.

Um dos mecanismos de destruição neuronal é a apoptose, um processo regulado de morte celular com mudanças morfológicas características, que incluem condensação



cromatínica periférica seguida de fragmentação nuclear e citoplasmática e subsequente fagocitose de “corpos apoptóticos”. Tem sido demonstrado que compostos de alumínio induzem neurodegenerescência e efeitos apoptóticos em vários modelos experimentais (Savory *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005). Há evidências de que o stress oxidativo, a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos reservatórios intracelulares e a perturbação das funções mitocondriais, podem representar passos importantes no mecanismo subjacente à morte celular induzida por alumínio (Guo & Liang, 2001; Ohyashiki *et al.*, 2002; Savory *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual o alumínio interage com as vias apoptóticas é apenas parcialmente compreendido, e permanece por identificar o sinal responsável pelo desencadeamento da morte celular por apoptose em resposta a exposição a alumínio. Tal como referido anteriormente, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  tem sido implicada na patofisiologia das doenças neurodegenerativas. Tem sido também evidenciado o papel crucial da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na transdução de sinais e na morte celular (apoptose, necrose e morte celular híbrida) (Yu, 2003). Estudos recentes demonstraram que a inibição específica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pode ter um papel fundamental na apoptose, sugerindo que a inibição da actividade desta enzima pode desencadear directamente a morte celular e aumentar marcadamente a susceptibilidade celular a outros promotores de apoptose (Yu, 2003).

Face às inúmeras possibilidades de interferência do alumínio em processos fulcrais para o funcionamento da célula, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da sua acção tóxica e, particularmente neurotóxica, são complexos e multifacetados. Deste modo, face à informação disponível, parecem existir, a nível celular, alguns alvos específicos do alumínio que, dada a sua natureza e função, podem estar na génese das acções neurotóxicas deste metal.

A hipótese de que a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  constitui um passo inicial no desencadeamento de danos celulares foi também analisada noutros modelos experimentais, tais como o insulto excitotóxico (Boldyrev *et al.*, 2000), hipóxia e isquemia (Kako *et al.*, 1988; Rosenkrantz *et al.*, 1996), stress oxidativo (Huang *et al.*, 1994; Lehotsky *et al.*, 1999) e apoptose induzida por cardenolídeos (Lees & Leong, 1994; Mann *et al.*, 2001). Estes estudos forneceram evidências convincentes a favor do envolvimento da inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em vias específicas de transdução de sinal, que podem também conduzir à morte celular.

#### **4. Objectivos do trabalho**

O século XX caracterizou-se pelo acentuado desenvolvimento industrial, não tendo sido acompanhado de preocupação consentânea com o impacto negativo na qualidade de vida das populações. Entre muitos outros aspectos, interessa realçar que a utilização do alumínio e dos seus compostos para os mais diversos fins é hoje generalizada, implicando a sua extracção da crosta terrestre em grande escala, e que as transformações ocorridas nas condições ambientais favorecem a sua biodisponibilidade. Por outro lado, é evidente que durante a exposição a alumínio ocorre bioacumulação e consequente intoxicação dos organismos expostos, podendo conduzir à morte. Os sintomas descritos como característicos das intoxicações por alumínio no Homem (tremor, perda de memória, alteração de linguagem, demência e convulsões) apontam para uma elevada vulnerabilidade do sistema nervoso central relativamente a este agente tóxico.

Actualmente desconhece-se o mecanismo de acção neurotóxica do alumínio, sendo porém notória a sua capacidade de interferência com diversos sistemas de comunicação celular, bem como com os processos celulares envolvidos nas transformações energéticas. Cerca de 40% do ATP produzido no cérebro é consumido pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Tal como anteriormente referido, o efeito inibitório do alumínio na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi observado por alguns investigadores durante os últimos 25 anos. O reconhecimento da importância fisiológica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na configuração funcional das células tem vindo a ser ampliado à medida que aumenta o conhecimento da sua variabilidade estrutural, mecanismos de regulação e relação com outras identidades moleculares. Por conseguinte, é lógico propor que a inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  provoque alterações diferenciadas no funcionamento das populações celulares, que o grau de inibição determine a extensão das modificações funcionais e que a variação do padrão de expressão da enzima condicione a sensibilidade a alumínio.

Evidenciar a participação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no mecanismo de acção neurotóxica do alumínio e caracterizar o efeito inibitório do alumínio na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$

em terminais nervosos isolados a partir do córtex cerebral do rato (sinaptossomas) constituíram os objectivos fundamentais deste trabalho.

Para o efeito, foi desenvolvido e caracterizado um modelo experimental que simulasse uma situação de intoxicação crónica por alumínio. A observação de que a acumulação de alumínio nos terminais nervosos provocou não só a inibição da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , mas também desequilíbrio do balanço prooxidante-antioxidante e modificações significativas ao nível da fluidez de membrana, implicou a análise da relação entre estas alterações e a acção inibitória do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . A caracterização do efeito do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  englobou o estudo comparativo da actividade enzimática em sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de ratos expostos a dieta enriquecida em alumínio (exposição *in vivo*) e em sinaptossomas incubados na presença de alumínio (exposição *in vitro*), bem como o estudo do efeito da exposição *in vivo* a alumínio na expressão proteica e na actividade das isoenzimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal.

## II - Materiais e métodos

---

### ***1. Manutenção dos animais em laboratório***

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar, machos com um mês de idade e ~250 g de peso, fornecidos pela Harlan Interfauna Ibérica, S. L.. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, numa câmara “Flufrance – A130 SN – Rech”, com temperatura ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e humidade ( $50\pm 10\%$ ) controladas.

Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração “Panlab AO4” e água potável contendo HCl a 0,02%. Antes do início do período experimental, os ratos permaneceram em quarentena durante duas semanas. As substâncias cujo efeito foi estudado foram administradas em requeijão coalhado com sumo de limão, sob a forma de soluções aquosas, de modo a garantir a ingestão voluntária e rápida da quantidade total fornecida. Aos animais que constituíram os respectivos grupos controlo foi administrado apenas requeijão coalhado com sumo de limão. A dieta dos grupos de ratos destinados a estudos *in vitro* não continha qualquer suplemento.

Os ratos foram pesados no início e no final do período experimental.

### ***2. Testes comportamentais***

Os testes comportamentais foram efectuados segundo o método descrito por Lukoyanov e Andrade (2000).

Em primeiro lugar, os animais foram testados em “campo aberto”. Este dispositivo consiste numa arena construída em acrílico cinzento (100 x 100 x 40 cm), cujo chão se encontra dividido, por riscos pretos, em 25 quadrados (20 x 20 cm) e em duas áreas: a área periférica (16 quadrados junto às paredes) e a área central (9 quadrados no centro). No início de cada ensaio, o rato foi colocado num quadrado do canto, virado para a parede. Cada rato foi testado em sessões de 5 min sob observação. Durante este período foi registado o número de vezes que o animal cruzou as linhas da grelha com as quatro patas na área periférica (actividade locomotora periférica), que cruzou as linhas na área central (actividade locomotora interna), que se levantou apoiado nas patas posteriores (actividade de “rearing”) e que defecou. Entre cada sessão o dispositivo foi limpo com água e seco.

Os ratos foram também testados na tarefa de “evitamento passivo”. O dispositivo consiste numa caixa de madeira (50 x 50 x 50 cm), cujo pavimento é uma grelha de aço constituída por varetas (3 mm de diâmetro) ligadas a um gerador de choques (A320 Isostim, WPI, Inc.), uma plataforma circular de madeira (15 x 5 cm), assente no centro da grelha, e um tubo de plástico (16 cm de diâmetro e 50 cm de altura), aplicado verticalmente sobre a grelha de forma a que a plataforma de madeira fique no interior do tubo. O rato foi colocado na plataforma de madeira, e o tubo de plástico foi removido 15 s depois. Avaliou-se então o estado latente, ou seja, o tempo que o rato demorou até dar um passo para a grelha com as quatro patas. Este procedimento de treino foi repetido três vezes com cada rato, em intervalos de 30 min. Na terceira vez, quando o rato desceu da plataforma de madeira para a grelha metálica, foi aplicada à grelha uma descarga eléctrica de 1 mA, durante 1 s, e o rato foi retirado e colocado na sua gaiola. O teste foi repetido após 24 horas, mas sem choque eléctrico.

### ***3. Preparação do material biológico***

Neste trabalho foram recolhidas amostras de sangue, urina e fezes dos ratos pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Foram também utilizados homogeneizados totais de córtex cerebral, rim, fígado e coração, bem como a fracção sinaptossomal, isolada a partir do córtex cerebral.

#### ***3.1. Homogeneização dos tecidos***

Após o sacrifício do rato por distensão cervical, seguida de decapitação, o fígado, o coração, os rins e o cérebro foram rapidamente removidos e colocados em sacarose 0,32 M, HEPES-Tris 10 mM, a pH 7,4. Todas as operações realizadas com vista à obtenção do material biológico foram efectuadas à temperatura de 0 - 4°C.

O fígado, o coração e os rins foram homogeneizados em nove volumes de sacarose 0,32 M tamponizada com HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. Para tal, usou-se um homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon, rodando a 600 rotações por minuto.

Relativamente ao cérebro, após a remoção do cerebelo e das meninges, o cérebro foi dissecado longitudinalmente segundo o sulco inter-hemisférico, separando-se o córtex. O tecido obtido foi homogeneizado em nove volumes de sacarose 0,32 M tamponizada com HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. Para tal, usou-se um homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon, rodando a 600 rotações por minuto.

Os homogeneizados assim obtidos foram congelados a -80°C ou mantidos em gelo, consoante o tipo de ensaio a que se destinavam.

### ***3.2. Isolamento da fracção sinaptossomal***

Após a obtenção do homogeneizado do córtex cerebral, procedeu-se à separação das estruturas celulares por centrifugação diferencial, de acordo com o método descrito por Hajós (1975) e modificado por Carvalho e Carvalho (1979).

O homogeneizado foi centrifugado a 1.500xg, durante 10 min. Os sedimentos obtidos ( $P_1$ ), constituídos por núcleos, glóbulos vermelhos e fragmentos celulares, foram desprezados. Em seguida, foi sedimentada a fracção sinaptossomal não purificada ( $P_2$ ) por centrifugação dos sobrenadantes, obtidos na fase anterior ( $S_1$ ), a 9.000xg durante 20 min.

O sedimento  $P_2$  foi ressuspenso num volume total de 4 ml de sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM (pH 7,4) e cuidadosamente aplicado sobre dois tubos de centrífuga, que continham 7,5 ml de sacarose 0,8 M. Após 30 min de centrifugação a 9.000xg, foi recolhida a fracção sinaptossomal dispersa na camada de sacarose 0,8 M. A tonicidade do meio foi reposta, por adição muito lenta de igual volume de água desmineralizada fria, agitando constantemente.

A suspensão de sinaptossomas foi centrifugada durante 30 min a 20.000xg. O sedimento obtido foi ressuspenso em 1 ml de sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM (pH 7,4) (concentração final de proteína ~8 mg/ml).

As fracções sinaptossomais assim obtidas foram congeladas a -80°C ou mantidas em gelo por um período máximo de 3 horas, consoante o tipo de ensaio a que se destinavam.

As centrifugações referidas foram efectuadas numa centrífuga refrigerada “Beckman, modelo Avanti J-25I”, equipada com o rotor J.A. 25.15.

#### ***4. Determinação da concentração de proteína***

A quantificação de proteína dos homogeneizados totais e das suspensões de sinaptossomas foi efectuada com recurso ao método colorimétrico do Biureto, descrito por Layne (1957).

Os alíquotas (50 µl) foram solubilizados com SDS a 10%. A reacção colorimétrica (formação de complexos violeta cupro-proteicos em meio básico) foi iniciada com a adição de 2 ml de reagente de Biureto (sulfato de cobre hidratado a 0,15%, tartarato de sódio e potássio a 0,6%, hidróxido de sódio a 3% e iodeto de potássio a 0,1%). A reacção decorreu durante 15 min à temperatura ambiente.

Simultaneamente e nas mesmas condições das amostras, foram preparados padrões de albumina sérica bovina, com valores de proteína compreendidos entre 10 e 20 mg de proteína/ml. As absorvâncias dos padrões e das amostras foram determinadas a 540 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P”. As concentrações de proteína foram obtidas por interpolação dos valores de absorvância obtidos na curva padrão de albumina sérica bovina e expressas em mg de proteína/ml.

#### ***5. Quantificação do alumínio***

A determinação dos conteúdos em alumínio das amostras foi efectuada por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (AACG) ou por espectrometria de emissão com plasma (ICP). O material de vidro e polietileno utilizado foi mergulhado em ácido nítrico 10% (v/v) durante 24 horas e enxaguado com água ultra-pura, para reduzir o grau de contaminação em alumínio.

O processamento das amostras para análise quantitativa por AACG foi iniciado por adição de TCA a 8% e ácido nítrico 0,2 N na proporção de 1:1 (v/v) a igual volume de amostra. Após extracção em gelo durante 30 min, as amostras foram centrifugadas a 6.000xg durante 10 min. As concentrações de alumínio presentes nos sobrenadantes foram então quantificadas a 309,3 nm no espectrómetro de absorção atómica equipado com



câmara de grafite “Perkin- Elmer 4100-UL” com sistema de amostragem automática “AS-70” após optimização das condições da análise, tendo em conta a matriz das amostras. As concentrações de alumínio nas amostras foram calculadas por extrapolação a partir de uma recta padrão construída a partir de soluções padrão de alumínio (10 - 40 ppb). Os resultados foram expressos em ng de  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína.

Para análise quantitativa por ICP, as amostras foram colocadas em vasos de teflon juntamente com ácido nítrico a 65%, introduzidas num sistema digestor de microondas “High Performance Unit Digestor – Milestone mls – 1200 mega” e submetidas a um programa adequado de potenciais de energia de microondas. As concentrações de alumínio foram então quantificadas a 396 nm no espectrómetro “Perkin-Elmer Plasma 400”, após optimização das condições da análise tendo em conta a matriz das amostras. As concentrações de alumínio nas amostras foram calculadas por extrapolação a partir de uma recta padrão construída a partir de soluções padrão de alumínio (0,5 a 5,0 mg/l). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$ /mg de amostra.

## **6. Caracterização morfológica da fracção sinaptossomal**

Considerando os fundamentos da microscopia electrónica de transmissão, as características inerentes aos materiais biológicos e os objectivos da utilização desta técnica foi necessário não só preservar a estrutura nativa das preparações, mas também protegê-las do ambiente hostil do microscópio electrónico. As amostras das fracções sinaptossomais foram preparadas segundo modificação do método proposto por Dodd *et al.* (1981).

As amostras foram fixadas na presença de 3 ml de glutaraldeído a 3%, preparado em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4), durante 2 h a 0 - 4°C. Após centrifugação a 4.000 rpm, durante 10 min, os sedimentos foram lavados 3 vezes em tampão fosfato. A pós-fixação das amostras decorreu durante 1 h e 30 min, a 0 - 4°C, na presença de 2,5 ml de solução de Dalton ( $\text{OsO}_4$  a 2% e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 0,7% em tampão fosfato 100 mM a pH 7,4). A solução de Dalton foi então removida por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 min, tendo os sedimentos sido lavados com tampão fosfato por três vezes. Procedeu-se de seguida à inclusão das amostras em agar a 3%. Para tal, depois da adição do agar a 45 - 50°C, as

amostras foram centrifugadas durante 20 min a 3.000 rpm, em “banho-maria” à mesma temperatura. As amostras foram fragmentadas em porções de 1 mm<sup>3</sup>. Estes fragmentos foram desidratados por exposição sequencial a uma série de concentrações crescentes de etanol: 20%, 40% e 60% (10 min); 75%, 90% e 95% (30 min); 100% (30 min - 4 vezes). Seguidamente, as amostras foram submetidas a infiltração com óxido de propileno (10 min + 15 min) e a impregnação gradual em Epon, sendo expostas sucessivamente e por períodos de uma hora às seguintes misturas: 2/3 óxido de propileno com 1/3 de Epon; 1/2 óxido de propileno com 1/2 de Epon; 1/3 óxido de propileno com 2/3 de Epon e finalmente 3/3 de Epon. As amostras foram colocadas em moldes apropriados, tendo a polimerização decorrido numa estufa durante 3 dias a 60°C.

As amostras assim incluídas em resina foram seccionadas no ultramicroscópio em secções ultrafinas, de espessura entre 100 e 150 nm. Em seguida, procedeu-se ao contraste com acetato de uranilo a 2% durante 15 min e citrato de chumbo (segundo Reynolds) durante 10 min (Salema & Santos, 1992). As observações realizaram-se num microscópio electrónico de transmissão “Hitachi H-9.000-NA”, utilizando uma tensão de aceleração de 100 kV.

### ***7. Determinação da libertação da lactato desidrogenase***

A integridade estrutural dos sinaptossomas foi avaliada por detecção da actividade da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação. A determinação desta actividade enzimática foi efectuada segundo o método descrito por Bergmeyer e Bernt (1974). Este método espectrofotométrico baseia-se na seguinte reacção enzimática:



O piruvato é convertido em L-lactato, por acção da LDH, sendo simultaneamente o NADH oxidado a NAD<sup>+</sup>. O consumo de NADH é seguido por registo do decréscimo da absorvância a 340 nm. O decréscimo de absorvância é directamente proporcional ao número de micromoles de substrato transformado.

Após a incubação dos sinaptossomas nas diferentes condições experimentais, os alíquotas (1 mg de proteína) foram centrifugados a 15.000 $\times$ g durante 5 min. O sobrenadante ( $S_1$ ) foi guardado em gelo e o sedimento foi ressuspensão em 2 ml de HEPES-Tris 10 mM (pH 7,4) e TritonX-100 a 1% e centrifugado a 15.000 $\times$ g durante 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante ( $S_2$ ) foi recolhido. Seguidamente, procedeu-se à determinação da actividade da LDH nos sobrenadantes  $S_1$  e  $S_2$ . Para o efeito, foi utilizado o “Kit Enzyline LDH/HBDH Optimisé Unitaire” da “BioMérieux”. Adicionaram-se 2,8 ml de Reagente 1 (tampão fosfato 50 mM a pH 7,5) ao frasco que continha o Reagente 2 (NADH 180  $\mu$ M). Adicionou-se 100  $\mu$ l de amostra e a reacção foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ l de Reagente 3 (piruvato 600  $\mu$ M). A absorvância foi registada a 340 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P” (intervalo de integração de 0,5 s) após 1, 2 e 3 minutos de reacção.

Designou-se por taxa de integridade dos sinaptossomas a proporção da actividade de LDH detectada no sobrenadante  $S_1$  expressa em percentagem da actividade total (soma das actividades de LDH detectadas nos sobrenadantes  $S_1$  e  $S_2$ ).

### **8. Quantificação dos nucleótidos de adenina endógenos**

Os nucleótidos de adenina foram extraídos das preparações sinaptossomais com ácido perclórico 0,2 M (1:2, v/v), a 4°C. Os alíquotas (1 mg de proteína) foram centrifugados a 15.800 $\times$ g durante 5 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram neutralizados por adição de KOH 10 M/Tris 5 M e centrifugados a 15.800 $\times$ g durante 10 min, a 4°C. Os nucleótidos de adenina endógenos (ATP, ADP e AMP) presentes nos sobrenadantes foram analisados por separação em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa, tal como descrito por Stocchi *et al.* (1985). Para o efeito, foi utilizado o sistema cromatográfico “Beckman System Gold”, que consiste numa bomba binária modelo 126 e num detector de UV variável 166, controlados por computador. A coluna usada na separação foi uma Lichmospher 100 RP-18 (5  $\mu$ m). Foi realizada eluição isocrática com tampão contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM e metanol a 1% a pH 7,4, com um fluxo constante de 1,2 ml/min. Os nucleótidos de adenina (TAN), ATP, ADP e AMP, foram detectados a 254

nm durante 6 min. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína e o potencial de carga energética adenínica (*ECP*) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$ECP = \frac{ATP + 0,5 * ADP}{TAN} \quad \text{[Equação 1]}$$

## 9. Determinação da fluidez de membrana

A fluidez da membrana sinaptossomal foi quantificada por anisotropia de fluorescência usando as sondas 1-(4-(trimetilamino)fenil)-6-fenilhexa-1,3,5-trieno (TMA-DPH) e 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), tal como descrito por Rego e Oliveira (1995). A fluorescência destas sondas é insignificante em meio aquoso, e a sua incorporação em membranas é acompanhada de elevado aumento do sinal de fluorescência. O DPH intercala-se entre as cadeias acil, permitindo a medição de alterações da fluidez de membrana ao longo da cadeia central dos lípidos na porção mais profunda da região hidrofóbica da bicamada lipídica. O TMA-DPH contém um substituto catiónico do trimetilamónio, que actua como uma âncora de superfície, e as alterações da anisotropia de fluorescência reflectem as alterações da fluidez ao nível das cabeças dos fosfolípidos e das porções superiores das cadeias lipídicas (região hidrofílica da bicamada).

As medições de anisotropia de fluorescência foram efectuadas num espectrofluorímetro “Perkin-Elmer LS 50B” assistido por um computador e equipado com suporte de cuvetes termostatzado e sistema controlado de polarização. Foram realizados ensaios preliminares para estabelecer as condições óptimas para efectuar as medições em equilíbrio dinâmico com DPH e TMA-DPH.

A incubação de sinaptossomas (0,125 mg de proteína/ml), a 30°C, com TMA-DPH 2 µM durante 5 min ou com DPH 2 µM durante 15 min, promoveu a marcação máxima da membrana sinaptossomal. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram ajustados a 360 nm e 430 nm, respectivamente. Após incorporação das sondas nas condições referidas, os valores de fluorescência mantiveram-se constantes durante pelo

menos 30 min. Os valores de anisotropia de fluorescência ( $r$ ) foram calculados usando a seguinte fórmula (Shinitzky & Barenholtz, 1978):

$$r = I_{||} - I_{\perp} / I_{||} + 2I_{\perp} \quad [\text{Equação 2}]$$

onde,  $I_{||}$  e  $I_{\perp}$  são, respectivamente, a intensidade de fluorescência da luz emitida medida em paralelo e em perpendicular ao plano de polarização do feixe de excitação.

O aumento do valor do parâmetro anisotropia de fluorescência reflecte uma diminuição na mobilidade da sonda e um aumento na ordem estrutural ou uma diminuição na fluidez membranar.

### 10. Determinação da acumulação de ácido $\gamma$ -aminobutírico

A determinação da acumulação de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) por sinaptossomas foi efectuada segundo o método anteriormente descrito por Santos *et al.* (1990).

Os ensaios de acumulação de GABA por sinaptossomas (concentração final de 0,5 mg de proteína/ml) foram realizados a 30°C, com agitação magnética constante, em 3,7 ml de meio contendo  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM, NaCl 128 mM, KCl 5 mM, AAOA 10  $\mu\text{M}$ , glicose 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4). Após pré-incubação de 5 min, as reacções foram iniciadas pela adição de 37  $\mu\text{l}$  de [ $^3\text{H}$ ]GABA 50  $\mu\text{M}$  (concentração final 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{Ci/ml}$ ) e finalizadas por filtração rápida sob vácuo de alíquotas de 0,5 ml, após vários intervalos de tempo (1, 2, 3, 4, 5, 10 e 15 min). Os filtros de microfibra de vidro Whatman GF/B (2,5 cm de diâmetro e 0,68 mm de espessura), nos quais os sinaptossomas ficaram retidos, foram pré-lavados e lavados, respectivamente, com 5 e 10 ml de meio contendo sacarose 320 mM, EGTA 0,1 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) a 4°C.

Seguidamente, os filtros foram inseridos em tubos de cintilação aos quais se adicionaram 3 ml de “Universol<sup>TM</sup> ES” (cocktail de cintilação) e, decorridas 12 h, a radioactividade foi quantificada por espectrometria de cintilação líquida num contador de cintilação líquida “Beckman LS 6000IC”.

Em cada experiência foi determinada a radioactividade presente no filtro, com base em ensaios realizados nas mesmas condições das amostras, mas na ausência de sinaptossomas, sendo este valor subtraído às restantes contagens. Foi ainda calculada para cada experiência a actividade específica de [ $^3\text{H}$ ]GABA no meio de reacção. A quantidade de [ $^3\text{H}$ ]GABA acumulada foi expressa em pmol/mg de proteína.

### ***11. Determinação da actividade da ATPase***

A actividade de ATPase das diferentes preparações biológicas foi determinada por quantificação do fosfato inorgânico produzido durante a hidrólise de ATP.

As reacções enzimáticas decorreram em 1 ml de meio de reacção constituído por NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM tamponizado a pH 7,4, na ausência ou presença de ubaína (inibidor específico da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ). Após incubação da amostra durante 15 min, a reacção foi iniciada pela adição de Mg-ATP e decorreu durante 5 min, num banho termostaticado a 35°C, com agitação. A adição de 250  $\mu\text{l}$  de TCA a 20%, previamente arrefecido, e a colocação dos tubos em gelo finalizou a reacção. Após centrifugação durante 5 min a 3.000 rpm, procedeu-se à quantificação do fosfato inorgânico no sobrenadante.

A reacção colorimétrica iniciou-se com a adição de reagente de molibdato (sulfato ferroso a 5% e molibdato de amónio a 1% preparado em ácido sulfúrico 1 N) e decorreu durante 5 min à temperatura ambiente. Simultaneamente, foi preparada uma curva padrão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0 - 85  $\mu\text{M}$ ). A intensidade da coloração de azul de molibdénio das amostras e da curva padrão foi quantificada a 660 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P”, e a quantidade de  $\text{P}_i$  produzida durante as reacções calculada a partir da curva padrão. A actividade medida na ausência de ubaína é designada actividade de ATPase total. A actividade de ATPase basal foi medida na presença de ubaína. A actividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  corresponde à diferença entre a ATPase total e a basal e foi expressa em nmol de  $\text{P}_i$ /mg de proteína/min.

Os valores da actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase foram analisados com a ajuda do programa do “Microcal™ Origin 6.0” para ajuste de curvas, usando uma regressão não linear e introduzindo a função de ajuste, representada pela combinação de dois termos de Hill:

$$Actividade\ da\ (Na^+ / K^+)ATPase = \left[ V_1 \times \left( \frac{[ATP]^{\bar{n}_H}}{K_1^{\bar{n}_H} + [ATP]^{\bar{n}_H}} \right) \right] + \left[ V_2 \times \left( \frac{[ATP]^{\bar{n}}}{K_2^{\bar{n}} + [ATP]^{\bar{n}}} \right) \right]$$

[Equação 3]

onde,  $V_1$  e  $V_2$  (nmol Pi/ min/ mg proteína) são as velocidades máximas.  $K_1$  e  $K_2$  (μM) são, respectivamente, as constantes semi-saturantes da primeira e segunda componente sigmoidal e  $n_H$  e  $n$  representam, respectivamente, o coeficiente de Hill e o número máximo de protómeros da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase a interagir.

As curvas de “dose-resposta” da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase para a ubaína foram analisadas de modo similar, mas usando a função de ajuste com um, dois ou três termos da Equação 4, representando a presença de um a três eventos inibitórios, independentes e não interconvertíveis, exibindo afinidades diferentes para a ubaína (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1990):

$$Actividade\ de\ (Na^+ / K^+)ATPase\ (\% \text{ do máximo}) = \frac{V_{m\acute{a}x}}{10^{(-K_I)} + 1}$$

[Equação 4]

onde,  $V_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima observada nas ausência de ubaína,  $I$  é o logaritmo decimal da concentração da ubaína e  $K_I$  é o logaritmo decimal da concentração que produz 50% de inibição ( $IC_{50}$ ).

## 12. Quantificação de lípidos

A fracção lipídica dos sinaptossomas foi extraída de acordo com o procedimento descrito por Folch *et al.* (1957). Os alíquotas (2,5 mg de proteína) foram vigorosamente agitados com a mistura clorofórmio/etanol (1:1) e a fase líquida foi recuperada por centrifugação a 600xg durante 15 min. Foi realizada uma extracção lipídica adicional por adição de 8 ml de uma mistura contendo clorofórmio e água (1:1), na presença de KCl 80 mM. A fase que contém o extracto lipídico foi separada por centrifugação e o solvente (o clorofórmio) foi evaporado sob corrente de azoto num evaporador rotativo. Os extractos lipídicos foram dissolvidos em 1,5 ml de clorofórmio e armazenados a -80°C sob atmosfera de azoto, até análise do seu conteúdo em colesterol e fosfolípidos.

O colesterol total dos extractos lipídicos foi quantificado pelo método colorimétrico descrito por Huang *et al.* (1961). Os alíquotas de extractos lipídicos (500 µl) foram dissolvidos em 100 µl de ácido acético glacial a 100%. A reacção colorimétrica foi iniciada com a adição de 2,5 ml de reagente de Liebermann-Buchard preparado de fresco (anidrido acético a 60%, ácido sulfúrico a 10%, ácido acético a 30% (v/v) e sulfato de sódio a 2% (p/v)), e decorreu durante 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Simultaneamente, nas mesmas condições das amostras, foram preparados padrões de colesterol com valores compreendidos entre 0 e 0,25 mg de colesterol/ml. As absorvâncias dos padrões e das amostras foram determinadas a 630 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P” e os resultados foram expressos em nmoles/nmoles de fosfolípido total.

Os fosfolípidos foram separados por cromatografia monodimensional em camada fina de sílica-gel (placas Whatman LK com 250 µm de espessura), usando como solvente a mistura clorofórmio/etanol/água/trietilamina (30:35:6:35, v/v) (Leray & Pelletier, 1987). Após lavagem com clorofórmio/metanol (1:1; v/v), a placa de sílica-gel foi embebida em ácido bórico a 2,3% preparado em etanol puro. Depois de seca à temperatura ambiente (~5 min) foi activada a 110°C durante 15 min. Os alíquotas (60 µl) contendo 200 µg de fosfolípidos foram aplicados na zona de concentração. Na mesma placa foram aplicados padrões de fosfolípidos (~30 µg de cada um) dissolvidos em clorofórmio. A placa foi



colocada na tina cromatográfica contendo a mistura clorofórmio/etanol/água/trietilamina (30:35:6:35, v/v). A migração decorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente.

As fracções lipídicas foram detectadas sob luz ultravioleta após pulverização com solução de primulina a 5% preparada em acetona/água (4:1; v/v). As manchas correspondentes aos locais onde se encontravam os diferentes fosfolípidos foram raspadas.

Seguidamente, procedeu-se à digestão dos fosfolípidos contidos na sílica-gel com 0,5 ml de ácido perclórico a 70%, durante 2 horas, a 180°C em banho de areia, com refluxo contínuo dos vapores condensados. Para a quantificação do fosfato inorgânico nos extractos lipídicos totais, os alíquotas (40 µl) foram evaporados cuidadosamente em bico de Bunsen até à secura, sendo depois digeridos tal como descrito acima. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foi adicionado a cada tubo 7,5 ml de reagente de molibdato (molibdato de amónio a 0,22% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2%). A reacção colorimétrica iniciou-se com a adição de 0,3 ml de reagente de Fiske-Subbarow (hidrogenosulfito de sódio a 15%, sulfito de sódio a 0,5% e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico a 0,25%) e decorreu durante 15 min em banho fervente.

As absorvâncias foram lidas a 830 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P”. A quantidade de P<sub>i</sub> foi calculada a partir da curva padrão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0-260 nmol). Após evaporação, à chama do bico de Bunsen, da água contida nos padrões, estes foram tratados do mesmo modo que as amostras. Os resultados foram expressos em percentagem do conteúdo total de fosfolípidos da amostra.

### ***13. Determinação de grupos carbonilo***

Os grupos carbonilo na fracção sinaptossomal foram quantificados por espectrofotometria após reacção com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, de acordo com o método descrito por Levine e modificado por Fagan (Levine *et al.*, 1990; Fagan *et al.*, 1999).

Os alíquotas (1 mg de proteína) foram centrifugados a 20.000xg durante 5 min à temperatura ambiente. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 500 µl de DNPH 10 mM preparado em HCl 2 M e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. A reacção

foi finalizada com a adição de 500 µl de TCA a 20%, à temperatura de 4°C. Após centrifugação a 20.000xg durante 5 min, a 4°C, os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1 ml de etanol/acetato de etilo (1:1), agitados vigorosamente, incubados durante 10 min e centrifugados (20.000xg durante 5 min, a 4°C). Este procedimento foi repetido 3 vezes. O último sedimento foi ressuspenso em 900 µl de meio contendo guanidina 6 M, NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM a pH 7,4 e incubado durante 15 min à temperatura de 37°C. Após centrifugação no regime anterior, para sedimentar a fracção insolúvel, os grupos carbonilo foram quantificados a 360 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P”.

A absorvância foi registada contra brancos, contendo amostras não submetidas ao tratamento com DNPH (amostras incubadas em 500 µl de HCl 2 M durante 1 hora, à temperatura ambiente). O conteúdo em grupos carbonilo das amostras foi calculado a partir dos valores de absorvância, utilizando o coeficiente de absorção molar da 2,4-dinitro-fenilhidrazona ( $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

#### ***14. Determinação de grupos sulfidrilo***

A concentração de grupos sulfidrilo (SH) nas fracções sinaptossomais foi determinada com o reagente de Ellman, ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitro)benzóico (DTNB) (Ellman, 1959), tal como descrito por Kurella *et al.* (1995).

Para determinar a quantidade de grupos SH, os alíquotas (0,3 mg de proteína) foram pré-incubados durante 30 min à temperatura de 37°C em 3 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 8,0) contendo EDTA 1 mM. A reacção foi iniciada pela adição de DTNB 0,6 mM e decorreu à temperatura de 37°C, durante 60 min. A absorvância foi medida a 412 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14 P” em regime de duplo feixe, atravessando o feixe de referência uma amostra processada na ausência de DTNB. A concentração de grupos SH nos sinaptossomas foi calculada usando o coeficiente de absorção molar do tionitrobenzoato ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em µmoles/mg de proteína.

### **15. Avaliação da presença de isoformas da subunidade $\alpha$ da $(Na^+/K^+)ATPase$**

A identificação das diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $(Na^+/K^+)ATPase$  presentes nas preparações biológicas foi realizada após extração, separação electroforética, electrotransferência das proteínas, seguida de imunodeteção com os anticorpos anti-NASE, anti-HERED e anti-TED, que identificam as subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , respectivamente. Estes anticorpos policlonais contra-coelho foram gentilmente oferecidos pelo Dr. Thomas Pressley da “Texas Tech University - Health Sciences Center”.

Amostras de homogeneizado total de cérebro, rim e coração, bem como da fracção sinaptossomal, foram ressuspensas, a 0 - 4°C, em tampão de lise contendo EDTA 1 mM, EGTA 1 mM,  $MgCl_2$  2 mM e HEPES 25 mM (pH 7,5), suplementado com fluoreto de fenilmetilsulfonilo 100  $\mu$ M, ditioneitol 2 mM e 1:1000 de uma mistura de inibidores de proteases contendo quimostatina, pepstatina A, leupeptina e antipain (1 mg/ml).

Os lisados foram misturados (1:1) com tampão contendo EDTA 5 mM, SDS a 6%, glicerol a 20%, 2-mercaptoetanol a 5%, azul de bromofenol a 0,02% e Tris-HCl 0,25 M (pH 6,8). De seguida, as amostras foram desnaturadas a 60°C durante 5 min e centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min a 24°C.

Para a separação electroforética das proteínas utilizou-se gel de separação de poliacrilamida a 7,5% (com 0,75 mm de espessura), preparado por adição sucessiva de 2,3 ml de água destilada, 1,5 ml de bis-acrilamida a 30%, 2,02 ml de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 0,13 ml de SDS a 10%, 0,07 ml de persulfato de amónio a 10% e 0,005 ml de TEMED. A polimerização do gel decorreu durante ~60 min à temperatura ambiente. Em seguida, colocou-se sobre o gel de separação uma camada de ~3 cm de gel de concentração de poliacrilamida a 4% (1,27 ml de água destilada, 0,27 ml de bis-acrilamida a 30%, 0,52 ml de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,0207 ml de SDS a 10%, 0,012 ml de persulfato de amónio e 0,0027 ml de TEMED). Este gel polimerizou durante ~45 min à temperatura ambiente. Após o enchimento do tanque de electroforese com tampão (glicina 0,05 M, Tris 0,5 mM e SDS a 0,1%), as amostras e o padrão “Broad Range” da “BioRad” foram aplicados no topo

do gel de concentração. O reservatório de electroforese foi ligado à fonte de alimentação sob uma voltagem constante de 100 V (até passar o gel de concentração) e, posteriormente, sob uma voltagem constante de 140 V. Este processo decorreu à temperatura ambiente e o circuito foi interrompido quando o azul de bromofenol percorreu o gel de separação.

De seguida, procedeu-se à electrotransferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) da “Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK” previamente activada por exposição sucessiva a metanol a 100% (5 s), H<sub>2</sub>O (5 min) e CAPS 10 mM a pH 11,0 preparado em metanol a 10% (5 - 30 min). O gel e membrana de PVDF foram colocados entre papel de filtro humedecido em solução de CAPS, e a “cassete” de electrotransferência foi fechada e introduzida na tina de electrotransferência, que já continha CAPS 10 mM (pH 11,0) preparado em metanol a 10%. A electrotransferência decorreu a amperagem constante de 0,75 A, a 4°C e com agitação, durante 90 min.

As membranas foram depois incubadas em leite magro 5% (p/v) preparado em TBS-T (Tris-HCl 25 mM a pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0,1%) durante 2 horas à temperatura ambiente, para bloquear a ligação inespecífica dos anticorpos. De seguida, foram incubadas com os anticorpos anti-NASE (1:1.000 diluição final), anti-HERED (1:500 diluição final) e anti-TED (1:1.000 diluição final), contra as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , e  $\alpha_3$ , respectivamente, durante 12 horas a 4°C. A expressão da actina foi usada como controlo para normalizar a quantidade de proteína por linha, pela incubação com o anticorpo monoclonal de rato anti- $\alpha$ -actina (1:500 diluição final) durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavadas com TBS-T com 0,5% de leite magro (p/v), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário de anti-coelho e anti-rato IgG (1:20.000 diluição final) durante 2 horas à temperatura ambiente.

As proteínas foram visualizadas usando um reagente quimioluminescente (ECF) da “Amersham Biosciences” cuja fluorescência foi detectada no Versa Doc “Imaging System Model 3000 BioRad”. O sinal de fluorescência foi analisado com o software “QuantityOne”.

## ***16. Análise estatística dos dados***

Os resultados apresentados neste trabalho representam a média  $\pm$  o erro padrão da média do número de experiências indicado nas legendas das figuras. Os dados foram tratados estatisticamente com o programa de computador “Microcal™ Origin 6.0”. A significância estatística entre dois grupos foi determinada pelo teste de *t* de *Student* e pela análise da variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados representativos de diferenças estatisticamente significativas.



### III - Resultados

---

## ***1. Caracterização do modelo experimental***

As vias de exposição do Homem ao alumínio são muito diversificadas. Alguns grupos de risco foram já identificados a nível ocupacional (trabalhadores da indústria de extracção e transformação do alumínio), clínico (pacientes em hemodiálise) e geográfico (habitantes do Guam no oceano Pacífico ocidental, da península de Kii no Japão e da faixa ocidental da Nova Guiné). Por outro lado, determinados hábitos de higiene, tais como o uso de antitranspirantes e cosméticos, parecem constituir factores de risco acrescido no que concerne a exposição ao alumínio. A título indicativo poder-se-á dizer que para a população em geral a principal fonte de alumínio é a alimentação, que constitui cerca de 95% da dose diária de alumínio. Deste modo, a via oral é a forma mais comum de exposição ao alumínio e, por conseguinte, a absorção a nível gastrointestinal desempenha um papel muito importante na determinação dos níveis de alumínio que se acumulam nos tecidos (Miller *et al.*, 1984; Driscoll & Schecher, 1988; Sollars *et al.*, 1989; Domingo *et al.*, 1993; Greger, 1993). A biodisponibilidade do alumínio varia de acordo com a forma ingerida e com os constituintes da dieta. Embora a fracção de alumínio absorvida seja relativamente reduzida, a absorção de alumínio varia com as condições de administração (Rodger *et al.*, 1991; Allain *et al.*, 1996).

Neste trabalho foram utilizados sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos Wistar, machos com um mês de idade e ~250 g de peso, aos quais se administrou, por via oral,  $\text{AlCl}_3$  em requeijão coalhado com sumo de limão, privilegiando-se o protocolo de exposição crónica (3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses: 0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia). A quantidade administrada foi estabelecida de acordo com valores previamente descritos como sendo capazes de promover neurotoxicidade (Braak & Braak, 1991; Florence *et al.*, 1994; Sarin *et al.*, 1997a, b; Kumar, 1998; Deng *et al.*, 2000).

Os sinaptossomas são fracções subcelulares do tecido nervoso formadas pelos terminais nervosos pré-sinápticos intactos, cujas membranas selaram no ponto de conexão com o axónio (Bradford, 1975, 1986). Os sinaptossomas constituem um modelo clássico em neuroquímica, uma vez que funcionam como “mini-células” metabolicamente autónomas (Nicholls, 1989), sendo também um modelo experimental muito usado em neurotoxicologia.



### **1.1. Protocolo de administração de alumínio**

Dadas as propriedades físico-químicas e as formas de ocorrência do alumínio no meio ambiente, parece consensual que a via de exposição mais comum a este metal é a sua ingestão tanto na água como em associação com outros alimentos (Miller *et al.*, 1984; Driscoll & Schecher, 1988; Sollars *et al.*, 1989; Domingo *et al.*, 1993; Greger, 1993).

Neste trabalho ambas as alternativas foram ensaiadas no sentido de otimizar a administração de  $\text{AlCl}_3$  aos ratos. Porém, face à incapacidade de controlar convenientemente as quantidades diárias, quando disponibilizadas na água fornecida (os ratos rejeitaram sistematicamente as soluções de alumínio), optou-se pela preparação de requeijão enriquecido em  $\text{AlCl}_3$  como veículo de administração. Assim, durante os períodos de exposição, antes de ser disponibilizada a ração diária, foram fornecidas pequenas porções de requeijão aos ratos que as ingeriram avidamente sendo, deste modo, possível o controlo das quantidades de  $\text{AlCl}_3$  administradas.

Optou-se por mimetizar um efeito crónico, uma vez que está descrito que os efeitos neurotóxicos do alumínio são mais severos quando produzidos por doses baixas durante um longo período de tempo (Greger, 1993). Assim, a um grupo de ratos foram administrados 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia) – efeito crónico – e ao respectivo grupo controlo, não foi administrado  $\text{AlCl}_3$ .

Como já foi referido todos os animais tiveram à sua disposição água com HCl a 0,02% e ração apropriada para ratos “Panlab AO4”. Os conteúdos em alumínio existentes na água e na ração foram determinados, respectivamente, por AACG e por ICP. Verificou-se que o teor em alumínio da água fornecida foi inferior a 12  $\mu\text{g/l}$  (limite de detecção do método de análise), enquanto que a ração continha aproximadamente 158 mg de  $\text{Al}^{3+}$ /kg de ração.

### **1.2. Avaliação da absorção e eliminação da dose de alumínio**

Regra geral, nos mamíferos, a absorção de alumínio é reduzida, devido às alterações de pH dos conteúdos gastrointestinais e à presença de fosfato na dieta (Venugopal & Luckey, 1978). Durante a exposição oral, a absorção é condicionada pela natureza química do composto de alumínio ingerido, pela presença de outros iões na dieta, bem como pela vitamina D e paratormona, entre outras substâncias (ATSDR, 1990). Em contrapartida, os

compostos de alumínio alteram a absorção de outros elementos no tracto gastrointestinal. Por exemplo, o alumínio inibe a absorção de fluoreto e pode diminuir a absorção de compostos de cálcio e ferro. Após absorção, o alumínio liga-se principalmente à transferrina e, em menor extensão, à albumina (Trapp, 1983; Bertholf *et al.*, 1984; Martin, 1986). De entre os processos de remoção do alumínio ingerido, destacam-se a eliminação nas fezes e a excreção na urina (Greger, 1993).

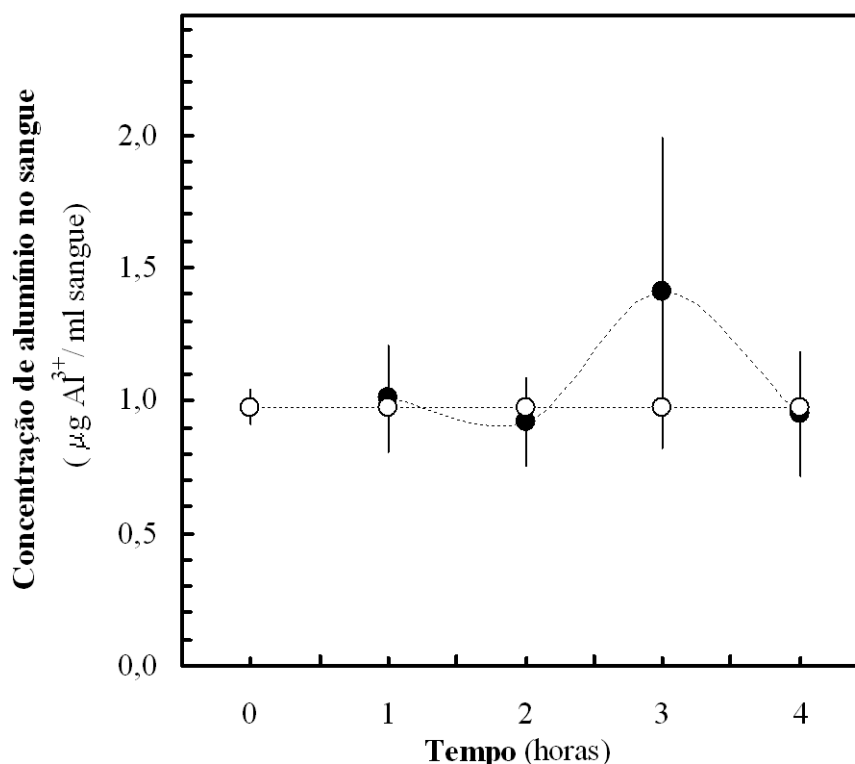
Com o objectivo de estudar a absorção, excreção e eliminação do alumínio, foi determinada a concentração de alumínio no sangue, urina e fezes dos ratos que receberam uma única dose de alumínio. O alumínio foi administrado por via oral, com a ajuda de uma sonda, de acordo com o procedimento descrito por Gupta *et al.* (1986). A quantidade administrada foi de 120 mg de  $\text{AlCl}_3$ /kg de peso corporal do rato.

Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, o que permitiu a recolha de urina e fezes durante o período experimental. Foram também recolhidas amostras de sangue para tubos de ensaio contendo EDTA. Após um jejum de 24 horas procedeu-se à administração oral de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ . As amostras de sangue foram colhidas antes e 1, 2, 3 e 4 horas após a ingestão. A urina e as fezes foram recolhidas diariamente antes e durante 4 dias após a administração. As amostras foram guardadas a 4°C até análise do seu conteúdo em alumínio. As amostras de sangue e urina foram analisadas por AACG, enquanto que o conteúdo de alumínio das fezes foi determinado por ICP.

Tal como se pode observar na Figura III.1, a concentração basal de alumínio no sangue dos ratos foi de  $0,98 \pm 0,25 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de sangue. A administração oral de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  alterou a concentração de  $\text{Al}^{3+}$  no sangue, tendo-se registado um pico de concentração máxima de  $1,41 \pm 0,83 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de sangue às 3 horas.

Na curva de concentração sanguínea, a fase crescente que vai até ao pico de concentração máxima reflecte prioritariamente a fase de absorção e disponibilização do alumínio aos tecidos, enquanto que a fase decrescente traduz a excreção, eliminação e partição do alumínio entre o sangue e outros tecidos. Por conseguinte, a natureza transitória do processo, associada à variabilidade inter-individual, ao carácter discreto das medições efectuadas e à dose de alumínio não permitiram encontrar qualquer significância

estatística da diferença entre a média amostral do pico de concentração máxima e as demais médias amostrais. No entanto, foi sempre notório o aumento transitório da concentração de  $\text{Al}^{3+}$  no sangue 3 horas após administração.

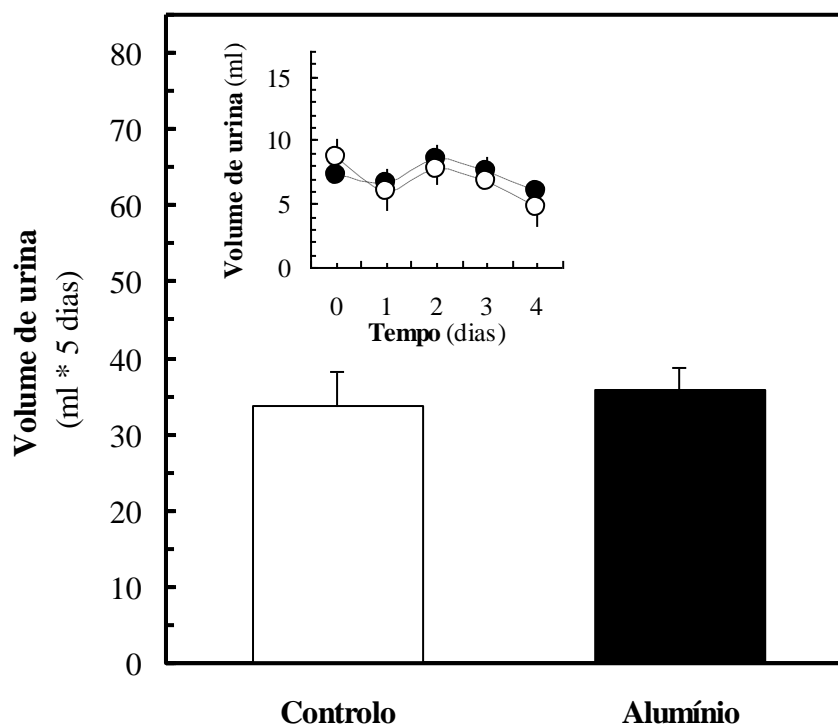


**Figura III.1. Concentração de alumínio no sangue.**

A quantidade de alumínio no sangue dos ratos controlo (○-○), ratos aos quais não foi administrado alumínio, e dos ratos que receberam 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (●-●) foi quantificada por AACG antes e após 1, 2, 3 e 4 horas de uma única administração de alumínio. As extracções de alumínio das amostras foram efectuadas por adição de TCA a 8% e ácido nítrico 0,2 N. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 determinações independentes.

Nas nossas condições experimentais, a administração de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  não modificou a micção. Tal como se pode observar na Figura III.2 o volume total de urina excretado pelos ratos controlo durante cinco dias foi de  $33,9 \pm 4,5$  ml. De forma similar, os ratos que ingeriram 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  excretaram um volume total de urina de  $35,9 \pm 3,0$  ml,

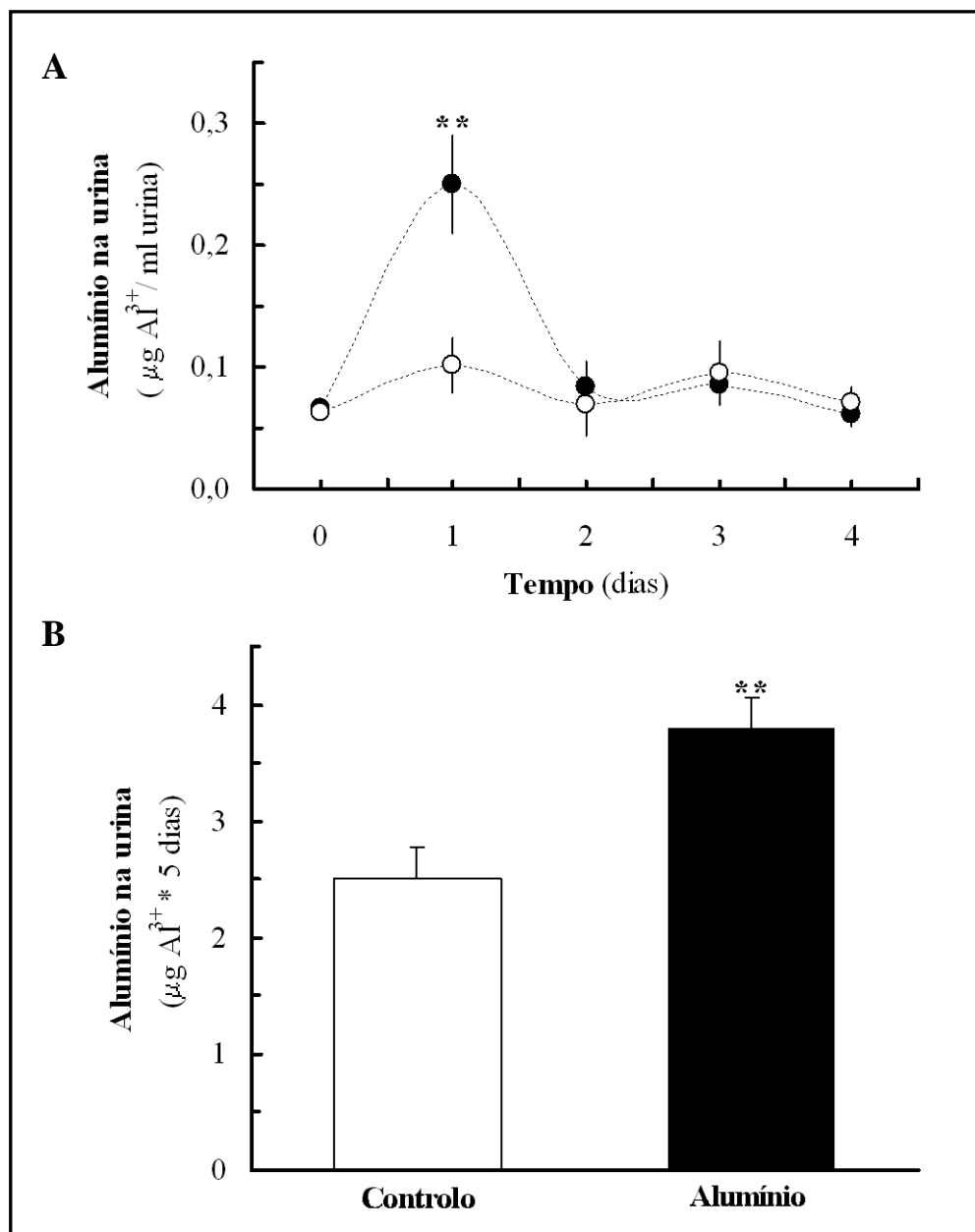
nos cinco dias de experiência. No gráfico incluso da Figura III.2 está representado o volume de urina excretada diariamente, sendo, em média, para os ratos do grupo controlo  $6,8 \pm 1,4$  ml e  $7,2 \pm 1,0$  ml para os ratos que ingeriram alumínio.



**Figura III.2. Efeito da administração de alumínio no volume de urina.**

A urina de ratos aos quais foram administrados 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (Alumínio ■) foi recolhida diariamente ao longo de cinco dias. Paralelamente, foi mantido um grupo de ratos controlo, aos quais não foi administrada nenhuma substância (Controlo □) e cuja urina foi também recolhida. O gráfico incluso representa o volume de urina excretado diariamente pelos animais das duas condições experimentais: Controlo (○-○) e Alumínio (●-●). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 determinações independentes.

De acordo com as quantificações de alumínio efectuadas na urina dos ratos controlo, os níveis basais de alumínio foram da ordem dos  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de urina (Figura III.3.A).



**Figura III.3. Excreção de alumínio na urina.**

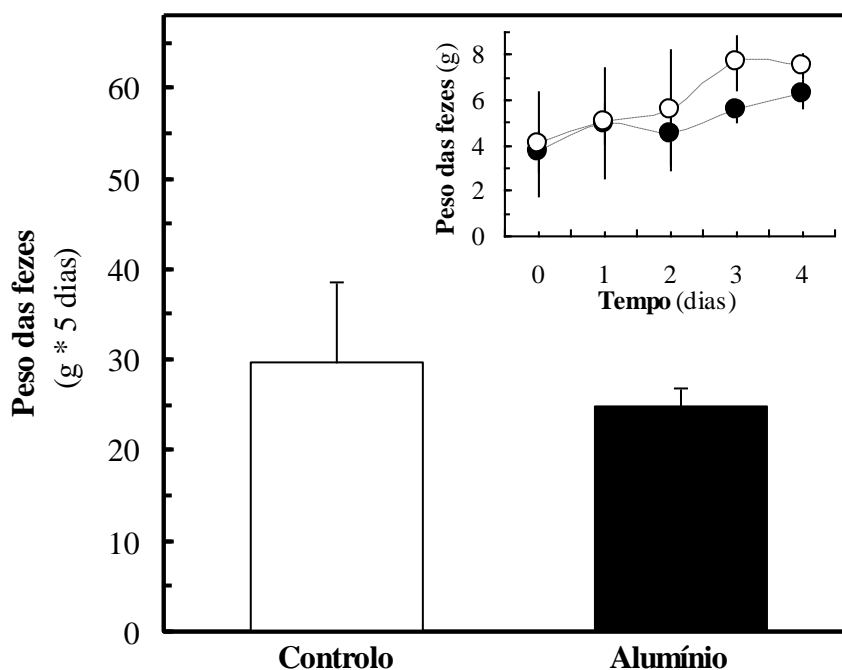
O alumínio foi quantificado por AACG em urina de ratos controlo, aos quais não foi administrado alumínio (○-○; Controlo) e em urina de ratos aos quais foram administrados 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (●-●; Alumínio). **Painel A:** Concentração de alumínio expressa em  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$ /ml de urina recolhida diariamente. **Painel B:** Quantidade de alumínio na urina recolhida ao longo dos cinco dias expressa em  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$  na urina\*5 dias. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 determinações independentes. \*\* $p < 0,02$ .

Após a administração oral de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ , registou-se um pico de excreção de alumínio ( $0,25 \pm 0,04 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de urina) no primeiro dia após a administração, retornando ao valor basal no segundo dia (Figura III.3.A). O Painei B da Figura III.3 representa a quantidade total de alumínio excretada nos cinco dias de experiência, que foi significativamente superior na urina dos ratos que ingeriram 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ . De facto, verificou-se um incremento de ~52% ( $2,50 \pm 0,27 \mu\text{g Al}^{3+}$  *versus*  $3,79 \pm 0,26 \mu\text{g Al}^{3+}$ ) na quantidade total de alumínio excretada.

Com o objectivo de estudar a eliminação de alumínio pela via intestinal, as fezes dos ratos controlo e dos ratos que ingeriram 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  foram recolhidas e o seu conteúdo em alumínio foi quantificado.

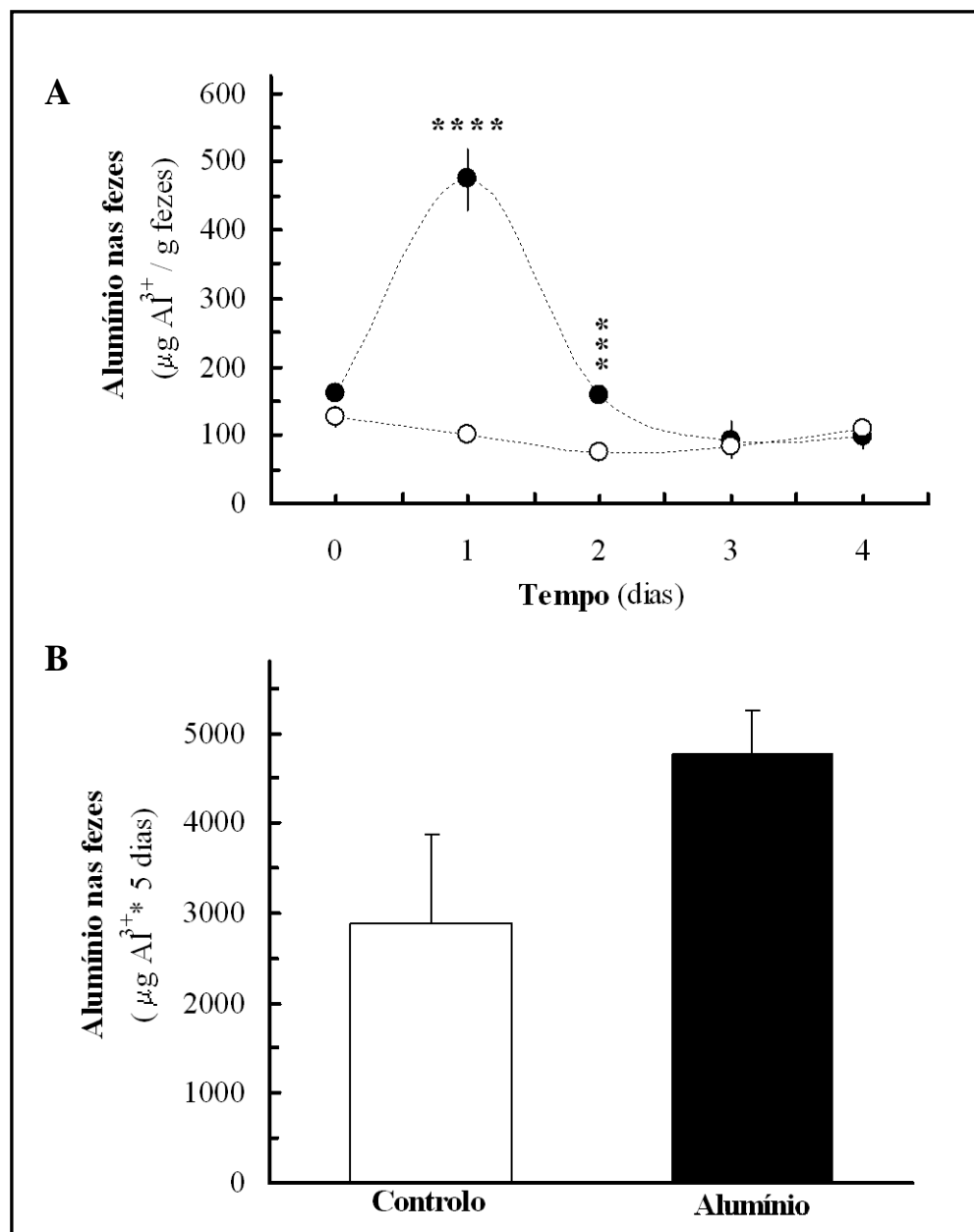
Verificou-se que esta ingestão não modificou a quantidade total de fezes eliminadas ao longo do período experimental (cinco dias) (Figura III.4). De facto, a defecação dos ratos controlo foi de  $29,8 \pm 9,0$  g de fezes, enquanto que a dos ratos que ingeriram alumínio foi de  $24,9 \pm 1,9$  g. A quantidade de fezes eliminadas diariamente pelos ratos nas duas condições experimentais também não foi alterada (gráfico incluso da Figura III.4).

De acordo com as quantificações de alumínio nas fezes dos ratos controlo, os níveis de alumínio foram da ordem dos  $98,8 \pm 9,2 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de fezes. A ingestão de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  originou um pico de eliminação de alumínio ( $474,3 \pm 45,3 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de fezes) no primeiro dia após a administração, retornando ao valor basal ( $93,0 \pm 27,8 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de fezes) no terceiro dia (Figura III.5.A). A quantidade total de alumínio eliminada pelos ratos controlo e pelos ratos que ingeriram  $\text{AlCl}_3$  foi respectivamente  $2.888,9 \pm 975,0 \mu\text{g Al}^{3+}$  e  $4.774,0 \pm 483,2 \mu\text{g Al}^{3+}$  (Figura III.5.B), correspondendo a um incremento de ~65%.



**Figura III.4. Efeito da administração de alumínio na quantidade de fezes.**

As fezes de ratos aos quais foram administrados 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (Alumínio ■) foram recolhidas diariamente ao longo de cinco dias. Paralelamente, foi mantido um grupo de ratos controlo, aos quais não foi administrado alumínio (Controlo □) e cujas fezes foram também recolhidas. O gráfico incluído representa a quantidade de fezes eliminadas diariamente pelos animais das duas condições experimentais: Controlo (○-○) e Alumínio (●-●). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 determinações independentes.



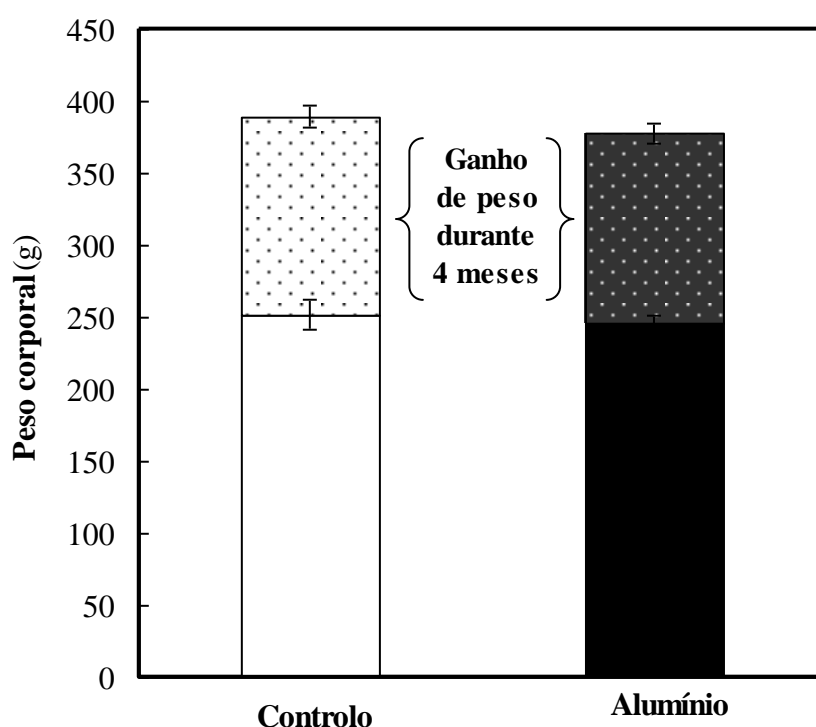
**Figura III.5. Quantidade de alumínio eliminado nas fezes.**

O alumínio foi quantificado por ICP nas fezes de ratos controlo, aos quais não foi administrado alumínio ( $\circ-\circ$ ) e nas fezes de ratos aos quais foram administrados 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  ( $\bullet-\bullet$ ). **Painel A:** Concentração de alumínio expressa em  $\mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de fezes (em base seca) recolhida diariamente. **Painel B:** Quantidade de alumínio eliminada pelas fezes durante cinco dias por ratos controlo (Controlo  $\square$ ) e por ratos aos quais foi administrado  $\text{AlCl}_3$  (Alumínio  $\blacksquare$ ). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 determinações independentes. \*\*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,01$ .



### 1.3. Avaliação do peso corporal

Tal como referido anteriormente, neste trabalho foram utilizados ratos Wistar, machos com um mês de idade e ~250 g de peso, aos quais se administrou, por via oral,  $\text{AlCl}_3$  em requeijão coalhado com sumo de limão, privilegiando-se o protocolo de exposição crónica (3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses). O período experimental alargado e a faixa etária dos ratos permitiram quantificar com rigor o efeito da exposição a alumínio tanto no peso corporal como no seu ganho (Figura III.6).



**Figura III.6. Efeito da exposição crónica a alumínio no peso corporal.**

Os ratos controlo (Controlo) e os expostos diariamente a 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses (Alumínio) foram pesados no início do período experimental e após os 4 meses de exposição. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 18 determinações independentes.

O peso corporal está sujeito a controlo por mecanismos metabólicos, hormonais e homeostáticos (Kennedy, 1969) e, por conseguinte, a sua alteração permite monitorizar

alterações fisiológicas associadas à toxicidade sistémica e pode ser útil para determinar a contribuição relativa da toxicidade geral dum composto (WHO, 2001).

No início da experiência os ratos pesavam  $249,0 \pm 5,8$  g e esse peso foi aumentado nos ratos controlo para  $389,1 \pm 9,0$  g, correspondendo a um ganho de peso ao longo de 4 meses de cerca de ~140 g. De forma similar o peso dos ratos expostos *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  aumentou para  $377,5 \pm 5,6$  g, correspondendo a um ganho de peso de ~130 g (Figura III.6). Por conseguinte, a administração diária, por via oral, de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses não modificou significativamente o peso corporal nem o seu incremento ao longo do tempo.

#### **1.4. Avaliação do comportamento**

Actualmente existem baterias de testes comportamentais desenvolvidas para avaliar competências gerais e específicas do sistema nervoso, que foram validadas utilizando agentes neurotóxicos bem caracterizados (IPCS, 1986; Cory-Slechta, 1989; Tilson, 1990; Tilson *et al.*, 1997). O comportamento reflecte a integração de várias componentes funcionais do sistema nervoso. As alterações de comportamento podem surgir a partir do efeito directo de um tóxico no sistema nervoso ou em consequência do seu efeito noutros sistemas fisiológicos (WHO, 2001). Em qualquer dos casos, os testes comportamentais são extremamente úteis na detecção precoce de alterações fisiológicas produzidas por agentes tóxicos (Tilson & Cabe, 1978).

Nas nossas condições experimentais, durante a administração *in vivo* de 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses não foram registados episódios convulsivos, de tremor ou paralisia, bem como não foram notadas alterações na ingestão de alimento e água. Tal como referido anteriormente, também não ocorreu qualquer alteração significativa ao nível do ganho de peso corporal, que, por seu turno, pode ser considerado como parâmetro de avaliação comportamental numa fase primária.

No final do período de exposição a alumínio, foram efectuados testes mais específicos para avaliação inicial da motórica e funções cognitivas, nomeadamente o teste em campo aberto e o teste de evitamento passivo. Estes testes têm sido usados para avaliar o efeito agudo e crónico de neurotóxicos (MacTutus *et al.*, 1982; MacPhail *et al.*, 1989; Shaughnessy *et al.*, 1994).

As actividades exploratórias e locomotoras foram medidas no teste em campo aberto, tendo sido quantificados os movimentos verticais de “rearing”, os movimentos horizontais periféricos e centrais e a defecação (Tabela III.1). Estes parâmetros, na sua globalidade, permitem analisar o comportamento emocional, nomeadamente a reactividade, a ansiedade e a habituação à novidade.

**Tabela III.1. Efeito da exposição crónica a alumínio no desempenho no teste em campo aberto.**

	<b>Controlo</b>	<b>Exposição <i>in vivo</i> a AlCl<sub>3</sub></b>	<b><i>F ; P</i></b>
<b>Actividade exploratória</b> (nº de “rearings”)	5,0 ± 1,7	5,0 ± 1,6	0,00 ; 1,00
<b>Actividade locomotora periférica</b> (nº de linhas atravessadas na periferia)	10,3 ± 4,8	10,1 ± 4,4	0,06 ; 0,81
<b>Actividade locomotora central</b> (nº de linhas atravessadas no centro)	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,06 ; 0,81
<b>Defecação</b> (nº de defecações)	3,0 ± 0,6	2,3 ± 0,8	0,14 ; 0,72

Os ratos controlo (Controlo) e os expostos diariamente a 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub>) foram testados em “campo aberto”. O número de linhas atravessadas pelos ratos em cada sessão de 5 min, na zona periférica ou na zona central do “campo aberto” representam respectivamente a “Actividade periférica” e a “Actividade central”. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 determinações independentes.

No teste em campo aberto, o rato que exhibe níveis superiores de actividade locomotora periférica, permanece mais tempo imóvel ou defeca mais é considerado mais “ansioso/emotivo” que aquele que possui actividade locomotora central superior. Durante a sessão experimental de 5 min, os ratos controlo executaram 5,0 ± 1,7 “rearings”, cruzaram as linhas da zona periférica 10,3 ± 4,8 vezes e as de zona central 0,7 ± 0,3 vezes e efectuaram 3,0 ± 0,6 defecações. Nas mesmas condições, os ratos que tinham ingerido diariamente 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses executaram 5,0 ± 1,6 “rearings”, cruzaram as linhas da zona periférica 10,1 ± 4,4 vezes e as de zona central 0,3 ± 0,3 vezes e efectuaram 2,3 ± 0,8 defecações. Em suma, no teste em campo aberto não foram detectados quaisquer

indícios de alteração comportamental provocada pelo protocolo de exposição crónica a alumínio usado neste trabalho.

O teste de evitamento passivo foi utilizado para despistagem de alteração de processos cognitivos (aprendizagem e memória). Apesar da complexidade inerente à avaliação destes parâmetros, o referido teste tem sido considerado bastante profícuo em neurotoxicologia (Lukoyanov & Andrade, 2000; Vallée *et al.*, 2001; Colomina *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003 Parle & Dhingra, 2003). O procedimento adoptado incluiu uma sessão de pré-teste para determinação da latência inicial de resposta e aplicação de reforço negativo (choque eléctrico) e uma sessão de teste de retenção, após 24 horas, para determinação da latência subsequente de resposta.

No protocolo de extinção de evitamento passivo usado, o rato que ostenta valores de latência subsequente de resposta (sessão de teste de retenção) superiores aos registados de latência inicial de resposta (sessão de pré-teste) é considerado como possuindo a faculdade de reter informação (memória retentiva e aprendizagem). O desempenho neste tipo de teste é influenciado por inúmeros factores adicionais, tais como a integridade da actividade motora, a sensibilidade ao estímulo utilizado como reforço negativo, o grau de habituação ao ambiente do teste.

Durante o pré-teste não foram observadas quaisquer diferenças significativas no desempenho dos ratos controlo e aqueles que tinham ingerido diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses (Tabela III.2).

Todos os ratos mostraram preferência acentuada pelo compartimento inferior, não demorando mais do que 16,0 s (ratos controlo) e 18,9 s (ratos expostos a  $\text{AlCl}_3$ ) a abandonar a plataforma de madeira. O valor de latência inicial de resposta foi de, respectivamente,  $9,0 \pm 2,8$  s e de  $10,3 \pm 1,2$  s para o grupo controlo e para o grupo de exposição, sugerindo uniformidade entre os dois grupos no que concerne os aspectos emocionais, motivacionais e de actividade motora, avaliada anteriormente no teste em campo aberto (Tabela III.1).

Durante a sessão de teste de retenção, a extinção de evitamento passivo dos ratos controlo foi superior à do grupo exposto a  $\text{AlCl}_3$ . O valor médio de latência subsequente de

**Tabela III.2. Efeito da exposição crónica a alumínio no desempenho no teste de evitamento passivo.**

	<b>Controlo</b>	<b>Exposição <i>in vivo</i> a AlCl<sub>3</sub></b>	<b><i>F</i> ; <i>P</i></b>
<b>Pré-teste</b> <b>Latência inicial de resposta (s)</b>	26,1 ± 8,2	26,8 ± 10,5	0,001; 0,967
<b>Teste de retenção</b> <b>Latência subsequente de resposta (s)</b>	90,3 ± 57,7	202,7 ± 50,1	1,693; 0,229

Os ratos controlo (Controlo) e os expostos diariamente a 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub>) foram avaliados durante a sessão de pré-teste três vezes consecutivas, sendo a última acompanhada de descarga eléctrica (1 mA) e uma vez, decorridas 24 horas, durante a sessão de teste de retenção (tempo limite de 300 s). Foi determinado o tempo, em segundos, que o rato demorou a descer da plataforma de madeira para a grelha com as quatro patas, durante o pré-teste (latência inicial de resposta) e durante o teste de retenção (latência subsequente de resposta). Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 determinações independentes.

resposta foi de 90,3 ± 57,7 s para o grupo controlo e o tempo máximo de permanência na plataforma superior foi de 202,0 s. No entanto, 4 dos 7 ratos pertencentes ao grupo de exposição ficaram no compartimento “seguro”, plataforma superior, até ao tempo limite do teste de retenção (300 s). Consequentemente, o valor médio de latência subsequente de resposta foi de 202,7 ± 50,1 s para os ratos que tinham ingerido diariamente 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses.

Em suma, o protocolo de exposição crónica a alumínio usado neste trabalho não provocou qualquer défice no desempenho no teste de evitamento passivo. No protocolo usado, a aprendizagem/memória do “medo” foi provocada por uma única exposição a um curto choque eléctrico 24 horas antes do teste de retenção, não tendo sido efectuada avaliação da sensibilidade à dor provocada nos dois grupos de ratos. Por conseguinte, o alongamento da extinção do comportamento de evitamento passivo registado pode não espelhar um melhoramento das competências de aprendizagem/memória, mas reflecte, inequivocamente, uma alteração comportamental indicativa de neurotoxicidade induzida pelo protocolo de exposição crónica a alumínio usado neste trabalho. Acresce referir que durante o manuseamento foi observado que os ratos expostos a alumínio são mais

“medrosos” do que os ratos controlo, evitando o tratador, eriçando o pêlo e demonstrando agressividade durante o contacto físico.

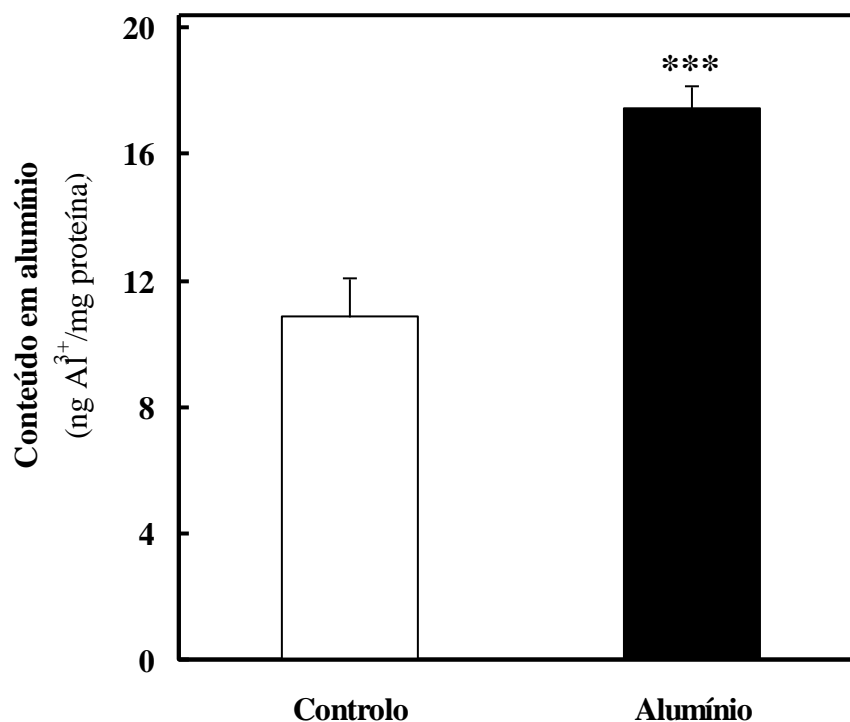
### ***1.5. Acumulação de alumínio nos terminais nervosos***

Análises *post-mortem* realizadas em indivíduos portadores da Doença de Alzheimer mostraram que a quantidade de alumínio no cérebro eram bastante elevadas (Wills & Savory, 1988; Meiri *et al.*, 1993). Por outro lado, foram encontrados tranças neurofibrilares em indivíduos que sofreram de encefalopatia induzida por alumínio (Wills & Savory, 1988; Meiri *et al.*, 1993). Apesar da via de exposição influenciar a distribuição e acumulação de alumínio nos diferentes órgãos, parece consensual considerar que as concentrações mais elevadas deste elemento se encontram nos ossos, no fígado, nos testículos, nos rins e no cérebro (Venugopal & Luckey, 1978). A retenção do alumínio no tecido ósseo é mais prolongada do que nos tecidos moles. No entanto, Yumoto e colaboradores (2003) mostraram que o período de prevalência do alumínio no tecido nervoso é bastante alargado.

Com o objectivo de verificar se o protocolo de administração de alumínio utilizado produzia acumulação adicional de alumínio nos terminais nervosos, procedeu-se à quantificação deste ião em sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo e ao grupo de exposição por AACG.

Da análise dos resultados apresentados na Figura III.7, referente às quantificações de alumínio nos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos controlo e de ratos expostos cronicamente a alumínio, foi possível constatar que a administração oral de alumínio produziu acumulação significativa deste metal. Por conseguinte, o estudo efectuado revelou que o protocolo desenvolvido para a administração oral de alumínio aos ratos era adequado, na medida em que promoveu um enriquecimento em alumínio dos sinaptossomas de cerca de 60%. O enriquecimento em alumínio dos sinaptossomas após a administração *in vivo* de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ /dia durante 4 meses foi de  $\sim 7 \text{ ng Al}^{3+}/\text{mg}$  de proteína relativamente à condição controlo, evidenciando a eficiência conjunta das barreiras gastrointestinal e hematoencefálica, bem como dos processos de eliminação no rato, demonstrada anteriormente (Figuras III.3 e III.5). Considerando o volume médio dos sinaptossomas igual a  $3,2 \mu\text{l}/\text{mg}$  de proteína (Scott & Nicholls, 1980), as variações dos

níveis de alumínio registadas podem corresponder a um aumento da sua concentração total de ~76  $\mu\text{M}$ .



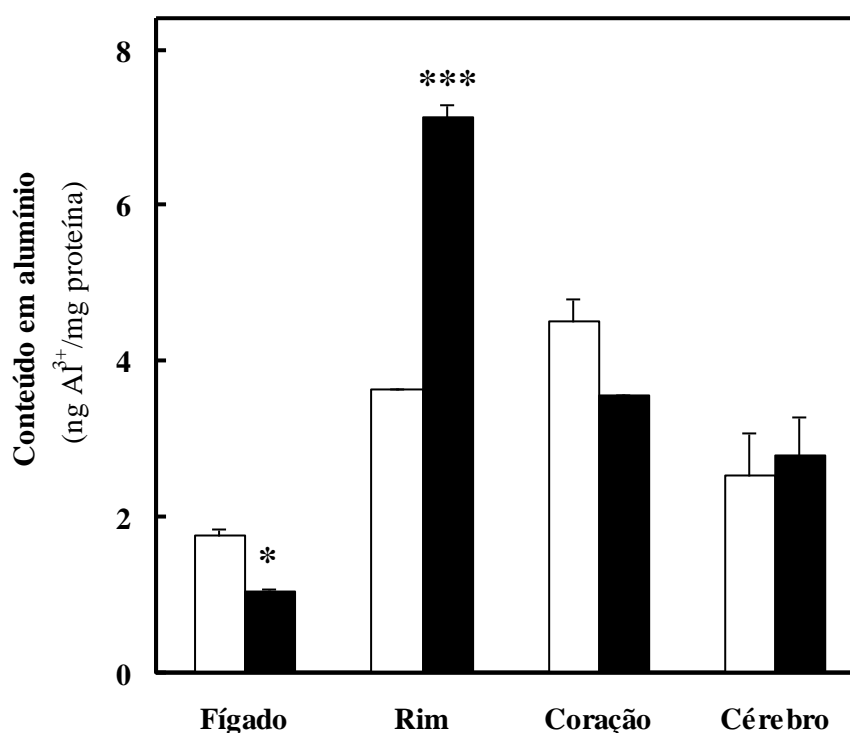
**Figura III.7. Efeito da exposição crónica a alumínio no conteúdo em alumínio dos sinaptossomas.**

O alumínio retido nos sinaptossomas foi quantificado por AACG. A branco estão representadas as quantificações nos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos controlo e a preto de ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses. As extracções de alumínio das amostras foram efectuadas por adição de TCA a 8% e ácido nítrico 0,2 N. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 a 7 determinações independentes. \*\*\* $p < 0,01$ .

Os terminais nervosos parecem constituir locais privilegiados de acumulação de alumínio. Na realidade, mesmo nas situações controlo os níveis nos sinaptossomas foram da ordem dos 10-11 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína (Figura III.7), enquanto que nos homogeneizados totais de cérebro não ultrapassaram os 2-3 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína (Figura III.8). Da análise dos resultados apresentados na Figura III.8, referentes às quantificações de alumínio no grupo controlo e no grupo de exposição, constatou-se que a administração oral de alumínio aumentou significativamente a concentração de alumínio nos rins,

duplicando o seu valor. Esta observação reforça a importância da via renal na excreção de alumínio (Figura III.3).

Por outro lado, não foi observado qualquer aumento da concentração de alumínio no fígado e no coração, sendo os valores, respectivamente, de ~1 e 4 ng Al<sup>3+</sup>/mg de proteína para o grupo controlo, e de ~2 e 4 ng Al<sup>3+</sup>/mg de proteína para o grupo de exposição. No homogeneizado de cérebro total não se observou qualquer aumento do conteúdo em alumínio estatisticamente significante.



**Figura III.8.** Efeito da exposição crónica a alumínio na acumulação de alumínio nos tecidos.

O alumínio contido nos homogeneizados totais de fígado, rim, coração e cérebro foi quantificado por AACG. A branco estão representadas as quantificações nos ratos controlo e a preto nos ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses. As extracções de alumínio das amostras foram efectuadas por adição de TCA a 8% e ácido nítrico 0,2 N. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 a 7 determinações independentes. \*p < 0,05 e \*\*\*p < 0,01.



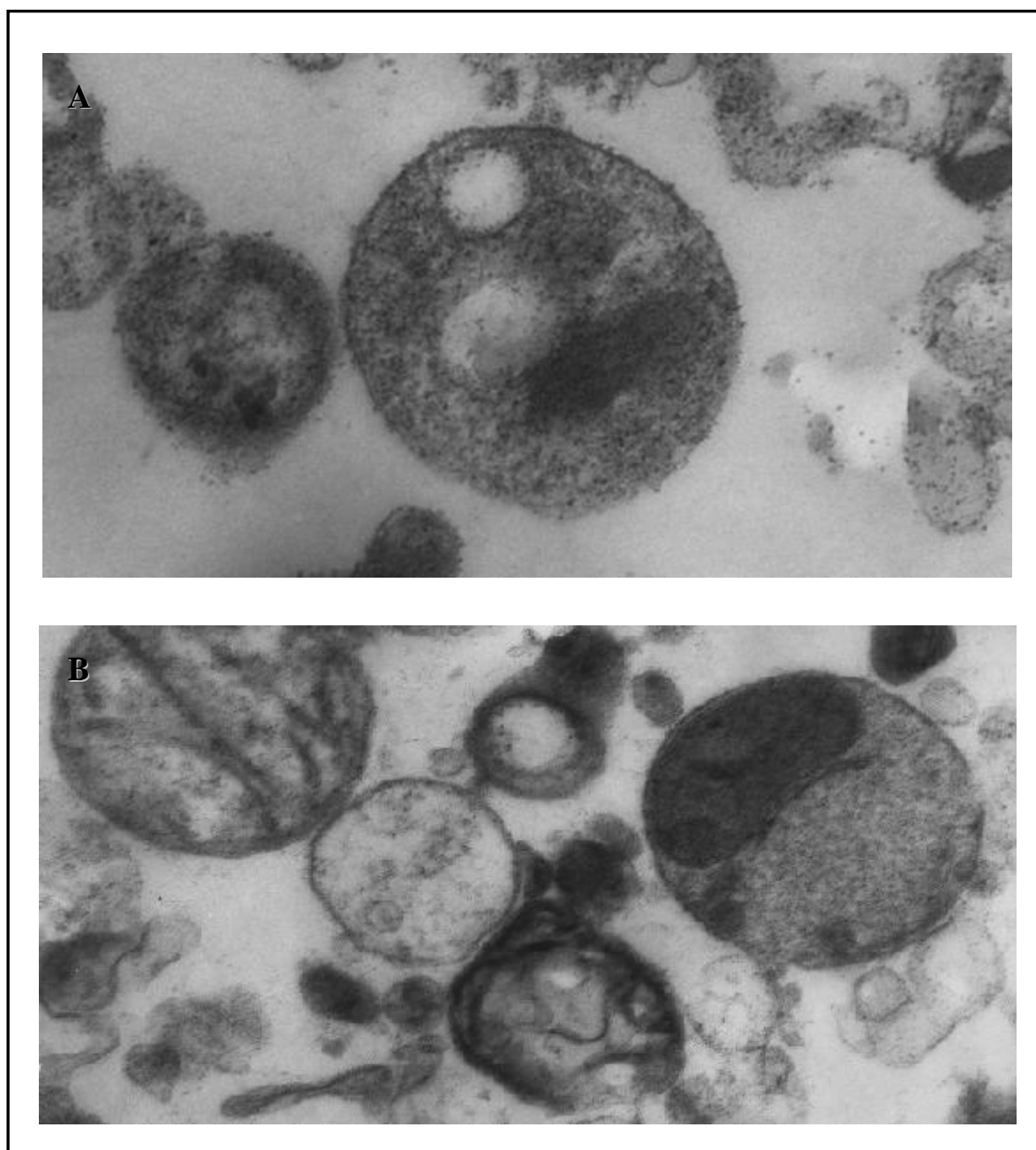
### ***1.6. Caracterização ultra-estrutural dos sinaptossomas***

Como se pode verificar na Figura III.9.A, os sinaptossomas isolados a partir de ratos controlo são constituídos, essencialmente, por vesículas de membrana singela, bem definida, e o seu interior apresenta-se compacto, sendo facilmente identificadas as vesículas sinápticas e mitocôndrias. Nas referidas preparações também se constatou a presença de contaminações, nomeadamente de estruturas multilamelares compactas, as bainhas de mielina e mitocôndrias extrasinaptossomais. A organização estrutural descrita, que corresponde à aparência característica de fracções sinaptossomais apresentadas por outros investigadores (Hajós, 1975), não se revelou modificada após os ensaios de toxicidade crónica. Quando observados ao microscópio electrónico de transmissão, os sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos aos quais foi administrado  $\text{AlCl}_3$  (0,03 g/dia) durante 4 meses não apresentaram alterações ultra-estruturais significativas (Figura III.9.B).

### ***1.7. Integridade da membrana plasmática dos sinaptossomas***

Com o objectivo de estudar o efeito da exposição crónica oral a alumínio na integridade da membrana plasmática dos sinaptossomas, foi avaliada a libertação da LDH para o meio de incubação. A LDH é uma enzima presente no citosol dos sinaptossomas, pelo que o aumento da sua actividade no meio de incubação dos sinaptossomas é indicativo de diminuição da integridade da membrana plasmática (Vassault, 1983; Koh & Choi, 1988; Pawels *et al.*, 1989).

A análise efectuada permitiu constatar que não ocorreram alterações significativas na libertação de LDH pelos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos expostos *in vivo* a alumínio ( $4,18 \pm 1,57\%$ ) relativamente aos sinaptossomas obtidos a partir do grupo controlo ( $3,59 \pm 1,29\%$ ) (Tabela III.3).



**Figura III.9. Efeito da exposição crónica a alumínio na ultra-estrutura sinaptossomal.**

As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 3% e solução de Dalton, impregnadas em epon e contrastadas com acetato de uranilo a 2% e citrato de chumbo (segundo Reynolds). Microfotografias por microscopia electrónica de transmissão de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos controlo (A) e de ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses (B). Ampliação original:  $\times 20.000$  (Painel A e B).

**Tabela III.3. Efeito da exposição crónica a alumínio na integridade da membrana sinaptossomal medida pela libertação da LDH.**

	<b>Libertação da LDH (%)</b>	<b>Actividade da LDH (U/ mg de proteína)</b>
<b>Controlo</b>	3,59 ± 0,45	0,018 ± 0,005
<b>Exposição <i>in vivo</i> a AlCl<sub>3</sub></b>	4,18 ± 0,46	0,018 ± 0,006

A quantificação da actividade da LDH foi efectuada em sobrenadantes de sinaptossomas isolados de ratos controlo (Controlo) e de ratos que receberam 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub>). Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão de 6 determinações independentes.

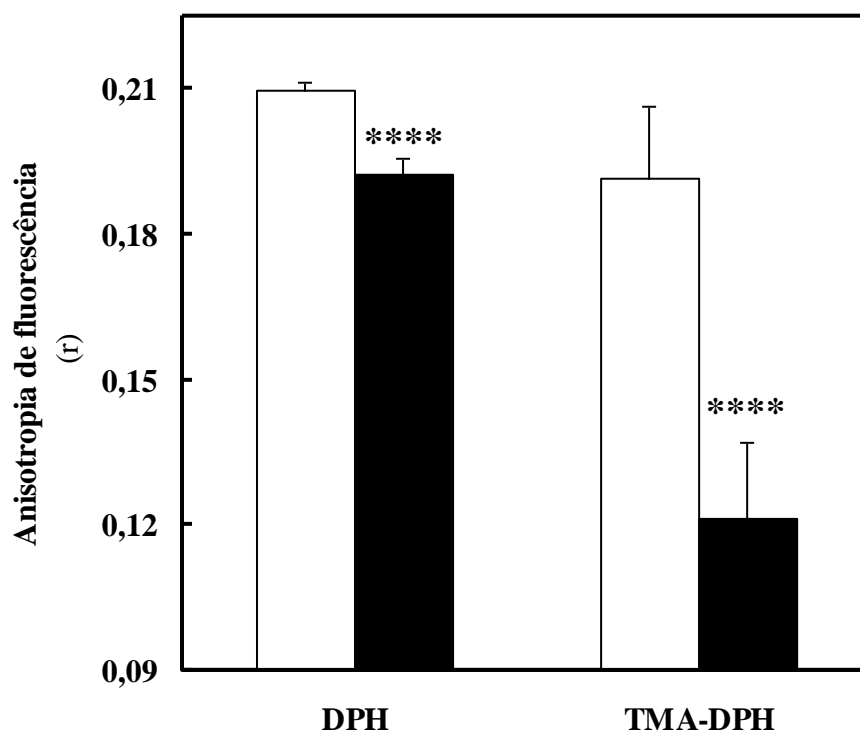
Quando a medição da actividade do marcador citosólico foi efectuada em sobrenadantes preparados por centrifugação de sinaptossomas lisados, os valores da actividade de LDH foram 0,018 ± 0,005 U/mg proteína (grupo controlo) e 0,018 ± 0,006 U/mg proteína (grupo de exposição). Por conseguinte, a taxa de libertação da LDH por sinaptossomas provenientes de ratos expostos a alumínio foi semelhante à observada nos sinaptossomas controlo, indicando que a integridade da membrana plasmática não foi modificada pelo protocolo de administração de alumínio adoptado.

### ***1.8. Fluidez da membrana plasmática dos sinaptossomas***

Partindo do princípio que o alumínio não afecta a integridade da membrana plasmática sináptica foi investigada a acção do alumínio na fluidez da membrana, uma vez que esta propriedade é extremamente importante para o normal funcionamento das proteínas integrais e periféricas da membrana plasmática (Kimmelberg & Papahadjopoulos, 1972; Silvius & McEhhaney, 1982).

A Figura III.10 mostra que a administração *in vivo* de alumínio reduziu ~8% a anisotropia de fluorescência do DPH incorporado na membrana sinaptossomal (0,21 ± 0,002 *versus* 0,19 ± 0,003), indicando uma fluidificação das regiões hidrofóbicas da membrana durante o tratamento com alumínio. De forma similar, a exposição crónica a alumínio também induziu um aumento da fluidez da região hidrofílica, uma vez que a anisotropia de fluorescência do TMA-DPH diminui ~37% (0,19 ± 0,01 *versus* 0,12 ± 0,01).

Assim, o protocolo de exposição crónica oral a alumínio produziu uma alteração significativa do estado global da matriz lipídica da membrana plasmática sináptica tanto na zona hidrofóbica como na zona hidrofílica.



**Figura III.10. Efeito da exposição crónica a alumínio na fluidez da membrana plasmática dos sinaptossomas.**

As alterações de fluidez foram quantificadas em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (Controlo □) e de ratos aos quais foram administrados diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (Alumínio ■) ao longo de 4 meses. As alterações da fluidez de membranas ao nível da região hidrofóbica e hidrofílica foram quantificadas pela anisotropia de fluorescência das sondas DPH (DPH) e TMA-DPH (TMA-DPH), respectivamente. As amostras de sinaptossomas (0,125 mg/ml), foram incubadas a 30°C, com DPH 2  $\mu\text{M}$  durante 15 min ou com TMA-DPH 2  $\mu\text{M}$  durante 5 min. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 9 determinações independentes. \*\*\*\* $p < 0,001$ .

### 1.9. Nucleótidos de adenina nos sinaptossomas

Para caracterizar o estado metabólico e/ou energético dos sinaptossomas, quantificaram-se os nucleótidos de adenina (ATP, ADP e AMP) endógenos, dado o seu papel central na regulação e integração do metabolismo celular. Os nucleótidos de adenina proporcionam substratos “prontos a usar” nas actividades celulares, e os seus níveis são mantidos por um balanço entre a produção e degradação por reacções enzimáticas específicas. O balanço entre os nucleótidos de adenina possibilita calcular o potencial de carga energética adenínica (ECP) que, por seu turno, oferece informação relativa à energia potencialmente disponível a partir do sistema adenínico para os processos celulares.

Os nucleótidos de adenina dos sinaptossomas foram quantificados por HPLC em extractos preparados com ácido perclórico (Tabela III.4).

**Tabela III.4. Efeito da exposição crónica a alumínio no equilíbrio energético nos sinaptossomas.**

	ATP/ADP	ECP
<b>Controlo</b>	3,42 ± 0,73	0,52 ± 0,01
<b>Exposição <i>in vivo</i> a AlCl<sub>3</sub></b>	2,82 ± 0,40	0,55 ± 0,01

A quantificação dos nucleótidos de adenina foi realizada por HPLC em extractos de sinaptossomas isolados a partir de ratos controlo (Controlo) e a partir de ratos que receberam 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub>). ECP representa o potencial de carga energética adenínica [Equação 1]. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão de 2 a 6 determinações independentes.

A exposição a alumínio não alterou o conteúdo sinaptossomal em nucleótidos de adenina. O ATP representou 44,8% e 45,2% de conteúdo total em nucleótidos para o controlo e para sinaptossomas isolados a partir de ratos expostos a alumínio, respectivamente. Os valores da razão ATP/ADP e de ECP, que reflectem a fracção molar de ligação de elevada energia (Hardie & Hawley, 2001) mantiveram-se constantes.

Em suma, a análise dos nucleótidos de adenina endógenos revelou que ambas as preparações sinaptossomais, a isolada a partir do grupo controlo e a isolada a partir do grupo de exposição, são energeticamente competentes e possuem níveis de ATP/ADP

similares. Da mesma forma, a exposição a alumínio também não induziu alterações do valor de conteúdo total em nucleótidos, sugerindo que o protocolo de exposição crônica oral a alumínio não comprometeu a integridade estrutural dos sinaptossomas, avaliada anteriormente no teste da libertação da LDH (Tabela III.3).

### ***1.10. Balanço prooxidante-antioxidante nos sinaptossomas***

Os íons de alumínio possuem valência fixa, não induzindo, por si só, stress oxidativo. No entanto, a presença de alumínio aumenta a extensão da peroxidação lipídica nos sistemas biológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Halliwell, 1991).

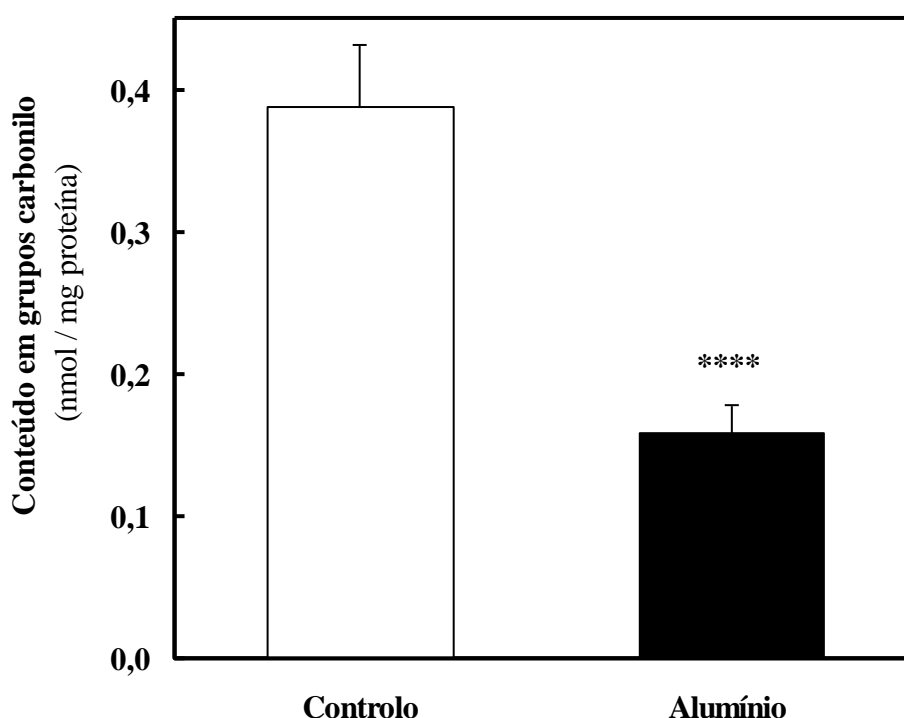
Os aminoácidos que constituem as proteínas são susceptíveis de serem atacados por agentes oxidantes. Durante a sua oxidação ocorre, entre outras alterações, a formação de grupos carbonilo, cuja quantificação é usada como marcador da progressão da oxidação proteica (Stadtman, 1993). Por outro lado, é comum a existência de grupos sulfidrilo (SH) reactivos nos resíduos de cisteína que integram as cadeias polipeptídicas das proteínas. Estes grupos podem ser oxidados, formando dissulfidos. As modificações operadas por agentes oxidantes nos grupos SH reactivos podem produzir alterações profundas ao nível da estrutura e função das proteínas, em virtude do seu papel determinante no estabelecimento da estrutura das proteínas, na catálise e nos sistemas antioxidantes celulares. Por conseguinte, foram quantificados os grupos carbonilo e os grupos SH como indicadores da ocorrência de modificações oxidativas das proteínas, em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos controlo e de ratos expostos *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ .

Relativamente aos níveis dos grupos carbonilo foi observada uma diminuição significativa (~60%) destes grupos nos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos expostos *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  (Figura III.11). Este resultado parece indicar que a exposição a alumínio causou um desequilíbrio acentuado no balanço prooxidante-antioxidante, incompatível com o aumento do grau de oxidação das proteínas sinaptossomais.

A Figura III.12 apresenta a reacção do DTNB com os grupos sulfidrilo presentes nos sinaptossomas isolados a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo e ao grupo de exposição ao longo do tempo. Nos primeiros 10 min observou-se uma diferença acentuada na progressão da reacção entre as duas preparações, porém a quantidade total de

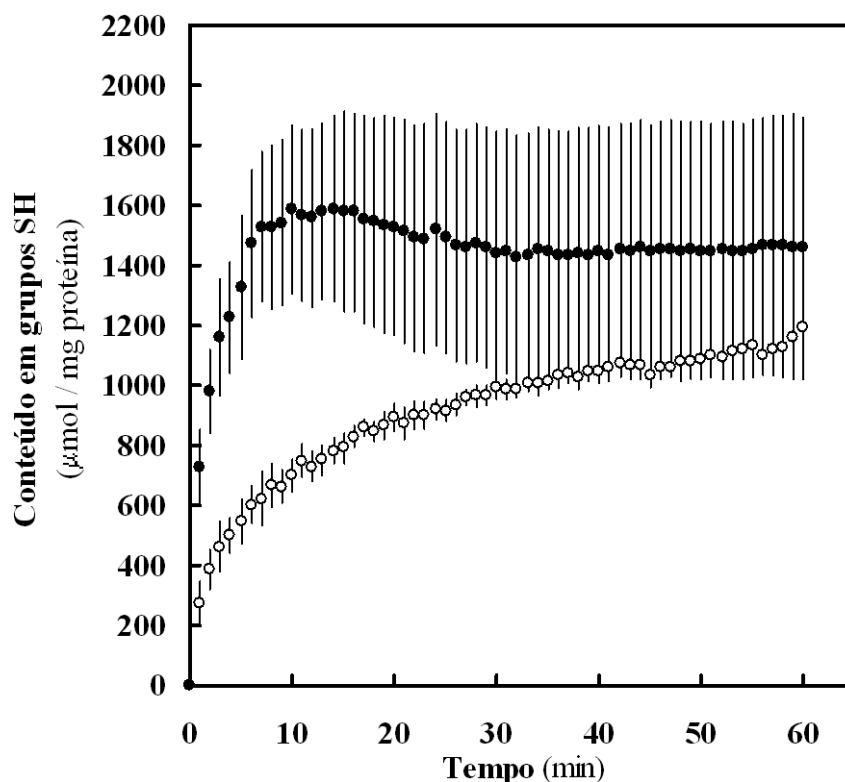
tionitrobenzoato produzido ao fim de 60 minutos de reacção não foi significativamente alterada. Deste modo, os resultados parecem indicar que a exposição *in vivo* a alumínio provocou uma maior exposição dos grupos SH, tornando-os mais acessíveis a DTNB.

Em virtude dos grupos carbonilo e SH terem sido quantificados em sinaptossomas e não em extractos proteicos, estes resultados devem ser interpretados apenas como indicativos da capacidade do alumínio alterar o balanço prooxidante-antioxidante global da preparação sinaptossomal.



**Figura III.11. Efeito da exposição crónica a alumínio no conteúdo em grupos carbonilo dos sinaptossomas.**

Os sinaptossomas (1 mg proteína) isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (Controlo □) e de ratos aos quais foram administrados diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (Alumínio ■) ao longo de 4 meses, foram incubados durante 60 min com DNPH 10 mM em HCl 2 M, à temperatura ambiente. As reacções foram finalizadas pela adição de TCA a 20% a 4°C e as alterações de absorvância foram registadas a 360 nm num espectrofotómetro. A concentração dos grupos carbonilo nos sinaptossomas foi calculada considerando o valor do coeficiente de absorção molar da 2,4-dinitrofenilhidrazona ( $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes. \*\*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura III.12. Efeito da exposição crónica a alumínio no conteúdo em grupos SH dos sinaptossomas.**

Os sinaptossomas (0,1 mg proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (○-○) e de ratos aos quais foram administrados diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  (●-●) ao longo de 4 meses, foram incubados a 35°C num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 100  $\mu\text{M}$  e HEPES-Na 10 mM (pH 7.4). As reacções foram iniciadas pela adição de DTNB 600  $\mu\text{M}$  e as alterações de absorvância foram registadas ao longo de 60 min, a 412 nm, num espectrofotómetro em regime de duplo feixe, tal como descrito previamente. A concentração dos grupos SH nos sinaptossomas foi calculada considerando o valor do coeficiente decimal de absorção molar do tionitrobenzoato ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes. \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

### **1.11. Actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal**

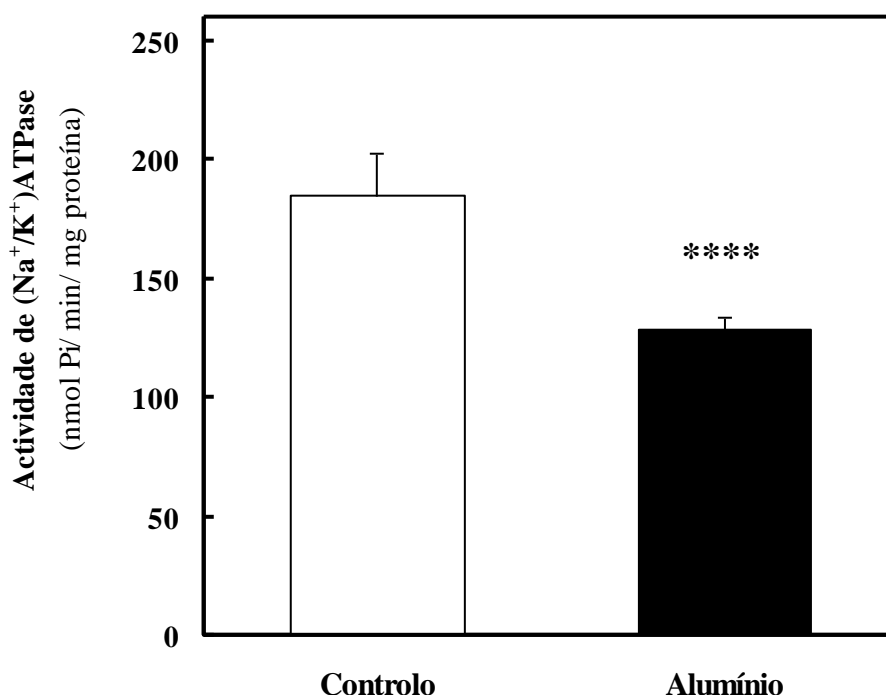
A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  utiliza ATP, como fonte energética para o transporte activo dos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e é inibida especificamente por ubaína.

Na Figura III.13 está representada a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de sinaptossomas, previamente congelados em azoto líquido e descongelados à temperatura ambiente.



Verificou-se que o valor da actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase dos sinaptossomas isolados a partir do grupo controlo foi  $185,2 \pm 17,2$  nmoles  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, enquanto que a actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase dos sinaptossomas isolados a partir do grupo que recebeu 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses foi  $128,9 \pm 5,2$  nmoles  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

O estudo efectuado revelou que o protocolo desenvolvido para a administração oral de alumínio aos ratos (0,03 g de  $\text{AlCl}_3/\text{dia}$  durante 4 meses) induz um efeito inibitório significativo (~30%) na actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase, quando medida em sinaptossomas previamente submetidos a congelamento/descongelamento.



**Figura III.13. Efeito da exposição crónica a alumínio na actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal.**

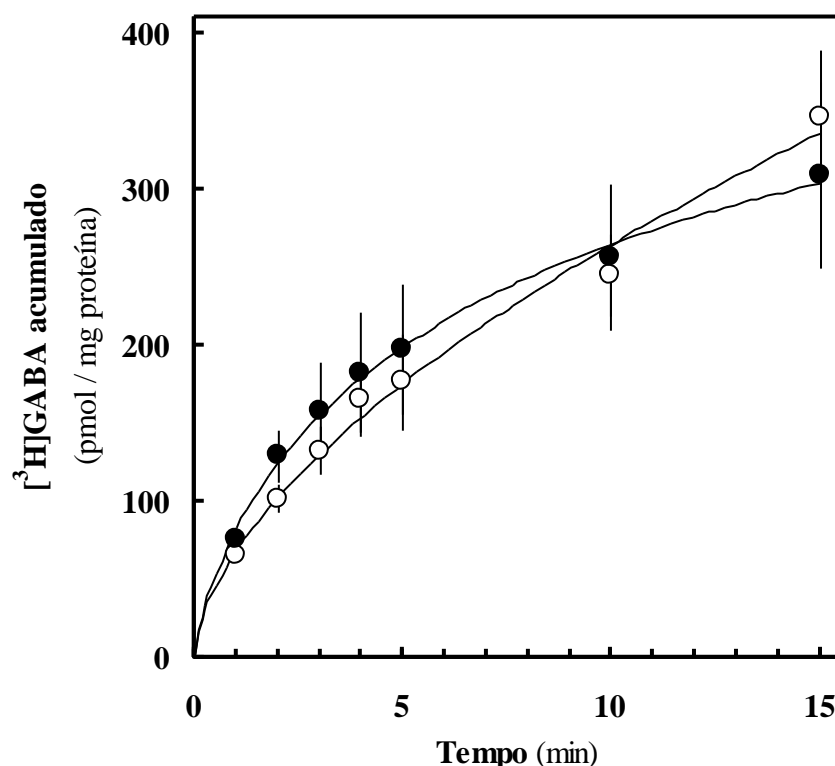
A actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase foi medida em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (Controlo □) e de ratos aos quais foram administrados diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses (Alumínio ■). As reacções decorreram a 35°C em 1 ml de meio de reacção ( $\text{NaCl}$  128 mM,  $\text{KCl}$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES- $\text{Na}$  10 mM a pH 7,4) na presença de 0,1 mg de proteína. A reacção foi iniciada pela adição de  $\text{Mg-ATP}$  1 mM. A actividade assim medida foi designada actividade total. A actividade basal foi medida na presença de ubaína 5 mM. A ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase foi determinada considerando a diferença entre a ATPase total e basal. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 6 determinações independentes. \*\*\*\* $p < 0,001$ .

### ***1.12. Acumulação do ácido $\gamma$ -aminobutírico pelos sinaptossomas***

O GABA é um aminoácido que desempenha a função de neurotransmissor, sendo considerado o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central dos mamíferos adultos (Krnjevic, 1970). O transporte de GABA através da membrana pré-sináptica dos terminais nervosos é principalmente assegurado pelo transportador de alta afinidade e depende do gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  (transporte activo secundário). Este sistema de transporte é extremamente importante na transmissão GABAérgica, pois participa na remoção do neurotransmissor da fenda sináptica, na manutenção do gradiente transmembranar de GABA e na sua libertação para a fenda sináptica em determinadas condições fisiológicas e patofisiológicas. O transporte de GABA através da membrana pré-sináptica dos terminais nervosos partilha algumas propriedades com outros sistemas de transporte de neurotransmissores, nomeadamente a dependência energética do gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  e ser mediado por proteínas integrais da membrana plasmática.

No presente trabalho, analisou-se o transporte de GABA por sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo e de ratos do grupo de exposição (Figura III.14), com o objectivo de avaliar o impacto das alterações da fluidez de membrana (Figura III.10) e da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III.13) no funcionamento dos sistemas de transporte activo secundário de neurotransmissores ao nível dos terminais nervosos pré-sinápticos.

A Figura III.14 representa a acumulação, ao longo do tempo, de GABA por sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo e de ratos do grupo de exposição. A quantidade de GABA acumulada pelos sinaptossomas aumentou gradualmente ao longo do tempo até atingir um valor máximo da ordem dos 325 pmol de GABA/mg de proteína. Verificou-se que a administração diária de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses não modificou significativamente a acumulação de GABA pelos sinaptossomas nas condições experimentais utilizadas.



**Figura III.14. Efeito da exposição crónica a alumínio na acumulação de GABA por sinaptossomas.**

A acumulação de GABA foi quantificada em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (Controlo ○-○) e de ratos aos quais foram administrados diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses (Alumínio ●-●). Os sinaptossomas (0,5 mg de proteína/ml) foram adicionados ao meio de reacção contendo [ $^3\text{H}$ ]GABA 0,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM, NaCl 128 mM, KCl 5 mM, AOAA 10  $\mu\text{M}$ , glicose 10 mM, EGTA 0,1 mM e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4). As reacções decorreram a 30°C e foram finalizadas por filtração rápida sob vácuo. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 5 determinações independentes.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que a fracção sinaptossomal isolada a partir de córtex cerebral de rato constitui um modelo experimental útil para avaliar os efeitos neurotóxicos do alumínio. De facto, o protocolo de exposição crónica a alumínio (administração diária de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ , em requeijão coalhado com sumo de limão, durante 4 meses) provocou acumulação de alumínio nos sinaptossomas e alterações significativas da fluidez de membrana, do balanço prooxidante-antioxidante e da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

## **2. Efeito do alumínio na fluidez da membrana pré-sináptica**

A monitorização das alterações da fluidez da membrana de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses, permitiu observar uma fluidificação da membrana, mais notória na região hidrofílica (Figura III.10).

Numerosas observações sugerem que a alteração da razão molar de colesterol/fosfolípidos totais ( $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$ ) ao nível das biomembranas podem condicionar a vulnerabilidade a intoxicações por alumínio (Nagyvary & Bradbury, 1977; Sperber *et al.*, 1991; Sparks *et al.*, 1994; 1995; Igbavboa *et al.*, 1996; Savory *et al.*, 1999; Farkas *et al.*, 2000; Refolo *et al.*, 2000; Atkinson, 2001; Bogdanovic *et al.*, 2001; Cucchiara & Kasner, 2001; Hartmann, 2001; Joseph *et al.*, 2001; Pandya *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001; Verstraeten *et al.*, 2002).

O estudo do efeito do alumínio na fluidez da membrana sinaptossomal englobou também a avaliação de alterações na composição lipídica da membrana plasmática sináptica e do efeito da razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  na acumulação de alumínio e nas alterações da fluidez de membrana induzidas por alumínio.

### **2.1. Protocolo de administração oral de alumínio e colestipol**

Trabalhos anteriormente realizados, mostraram que alterações nos níveis extracerebrais de colesterol provocam modificações no colesterol cerebral e nos receptores de lipoproteínas de baixa densidade presentes na barreira hematoencefálica (Malavolti *et al.*, 1991; Dehouck *et al.*, 1997). Neste âmbito, desenvolveu-se um método simples para alterar a razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  das membranas sinápticas durante a exposição oral a alumínio, que envolveu a adição de colestipol ao requeijão coalhado com sumo de limão. O colestipol é um fármaco normalmente usado nos tratamentos de hipercolesterolemia, e a sua eficácia na redução do nível de colesterol está principalmente relacionada com a diminuição dos níveis de colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade na corrente sanguínea (Illingworth *et al.*, 1981; Blankenhorn *et al.*, 1988; Gaw *et al.*, 1996). Para além do protocolo de administração de alumínio já apresentado, que consiste na administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g/dia) (efeito crónico) ( $\text{Al}_{\text{crónico}}$ ), estabeleceu-se outro protocolo de administração de alumínio, que mimetizou um

efeito sub-agudo, pela administração de 10,00 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 10 dias (1,00 g/dia) ( $\text{Al}_{\text{sub-agudo}}$ ). Paralelamente, a dois grupos de exposição a  $\text{AlCl}_3$  foram administrados diariamente 0,31 g de colestipol ( $\text{Al}+\text{Col}_{\text{sub-agudo}}$  e  $\text{Al}+\text{Col}_{\text{crónico}}$ ). Foram também mantidos dois grupos de animais que apenas receberam 0,31 g de colestipol/dia durante 10 dias ou 4 meses ( $\text{Col}_{\text{sub-agudo}}$  e  $\text{Col}_{\text{crónico}}$ , respectivamente) e dois grupos de animais que não receberam nem  $\text{AlCl}_3$  nem colestipol, e que foram mantidos durante 10 dias ( $\text{Ctrl}_{\text{sub-agudo}}$ ) ou 4 meses ( $\text{Ctrl}_{\text{crónico}}$ ), correspondendo aos grupos controlo.

## ***2.2. Efeito do colesterol na acumulação de alumínio dos terminais nervosos após administração oral de alumínio***

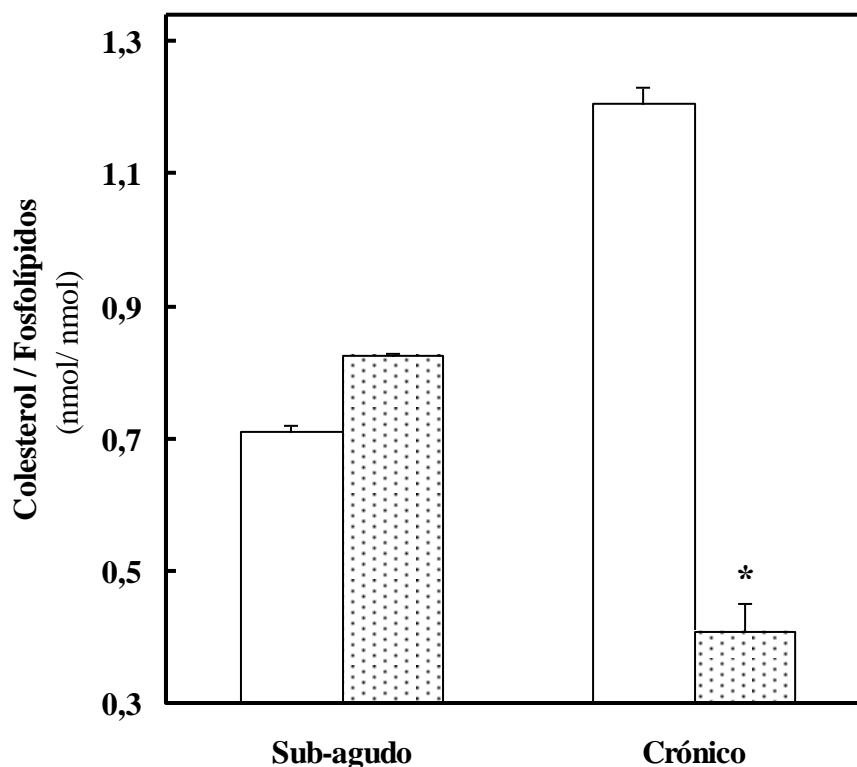
Durante a exposição a alumínio, a razão molar de  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  dos terminais nervosos isolados a partir do córtex cerebral de rato foi modificada pela ingestão de requeijão e colestipol.

A Figura III.15 mostra que as razões molares de  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  dos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato são bastante sensíveis às diferentes condições experimentais. Foi observado que a razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  dos sinaptossomas aumentou de 0,7 para 1,2 nmol/nmol, durante o período experimental (4 meses) e que este aumento foi prevenido pela administração diária de 0,31 g de colestipol que, por sua vez, reduziu a razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  dos sinaptossomas para 0,4 nmol/nmol.

A AACG permitiu verificar que o conteúdo em alumínio dos sinaptossomas (~11 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg proteína) permaneceu inalterado durante o período experimental (Figura III.16.A), não sendo afectado pela administração do colestipol (Figura III.16.B).

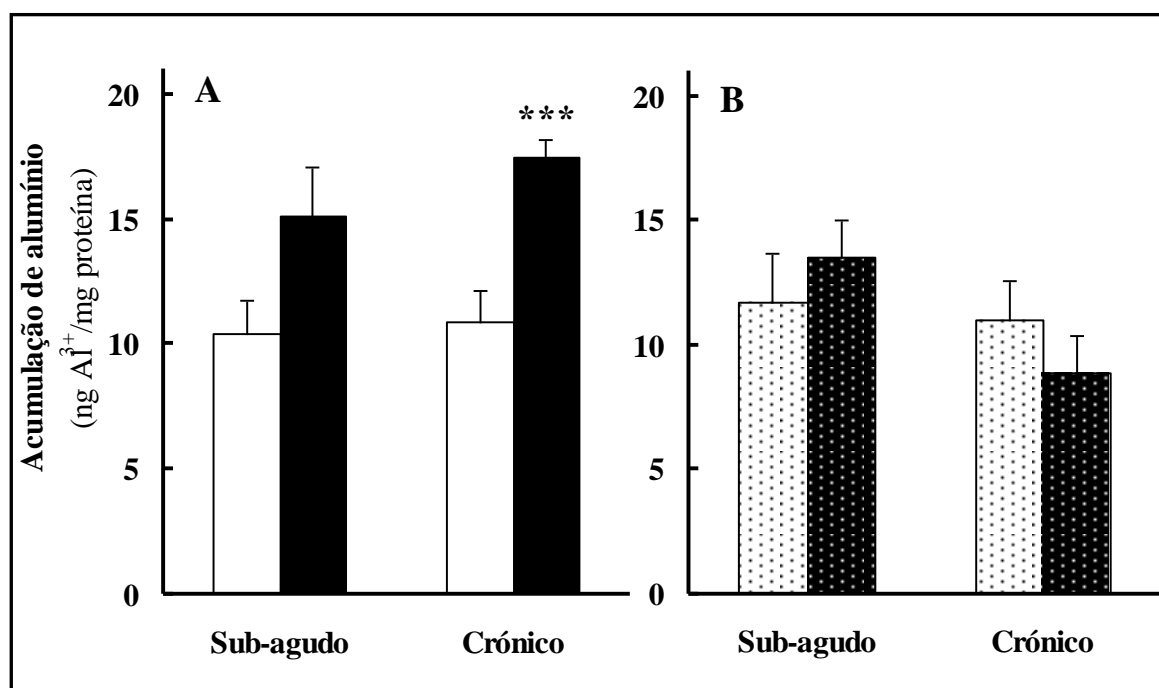
A exposição crónica a alumínio (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia, durante 4 meses) produziu um aumento de 59% no conteúdo sinaptossomal em alumínio (Figura III.16.A), que foi prevenido pela administração simultânea de colestipol (Figura III.16.B). Este efeito também foi observado após exposição sub-aguda (1,00 g  $\text{AlCl}_3$ /dia, durante 10 dias), que reduziu o conteúdo sinaptossomal de alumínio em 45%. Além disso, o conteúdo em alumínio de sinaptossomas de ratos expostos a alumínio e colestipol durante 4 meses (~9 ng/mg proteína) foi mais baixo do que o valor do controlo (~11 ng/mg proteína). É importante salientar que durante o período experimental não foram observadas mudanças significativas no peso corporal dos ratos, tanto na exposição sub-aguda ( $246 \pm 20$  g *versus*

$252 \pm 42$  g para ratos controlo), como na exposição crónica ( $378 \pm 22$  g *versus*  $389 \pm 39$  g para ratos controlo). Do mesmo modo, o ganho de peso ( $131 \pm 28$  g) não foi alterado após exposição crónica quando comparado com valores do controlo ( $137 \pm 33$  g). Em contrapartida, ocorreu enriquecimento em  $\text{Al}^{3+}$  nos sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral dos ratos expostos a alumínio (Figura III.16).



**Figura III.15. Efeito *in vivo* da administração de colestipol na razão molar de colesterol/fosfolípidos totais dos sinaptossomas.**

Nesta série de experiências foram administrados 0,31 g/dia de colestipol (▤) aos Col<sub>sub-agudo</sub> e Col<sub>crónico</sub>, mantendo-se os grupos Ctrl<sub>sub-agudo</sub> e Ctrl<sub>crónico</sub> como animais controlo (□). Col<sub>sub-agudo</sub> e Ctrl<sub>sub-agudo</sub> foram sacrificados após 10 dias (Sub-agudo), enquanto que Col<sub>crónico</sub> e Ctrl<sub>crónico</sub> foram sacrificados após 4 meses (Crónico). Os sinaptossomas foram isolados a partir do córtex cerebral de rato e preparados para a determinação da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub>. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 8 determinações independentes. \* $p < 0,05$ , significativamente diferente do grupo controlo crónico (Ctrl<sub>crónico</sub>).



**Figura III.16.** Efeito da exposição *in vivo* a alumínio e colestipol no conteúdo sinaptossomal em alumínio.

**Painel A:** A dieta dos grupos Al<sub>sub-agudo</sub> e Al<sub>crónico</sub> (■) foi suplementada com 1,00 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 10 dias (Sub-agudo) e 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Crónico), respectivamente. Os grupos Ctrl<sub>sub-agudo</sub> e Ctrl<sub>crónico</sub> (□) correspondem aos animais controlo. **Painel B:** A dieta diária dos grupos Al+Col<sub>sub-agudo</sub> e Al+Col<sub>crónico</sub> (■) foi suplementada com 0,31 g/dia de colestipol e 1,00 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 10 dias (Sub-agudo) e 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Crónico), respectivamente. Col<sub>sub-agudo</sub> e Col<sub>crónico</sub> (▤) correspondem aos grupos de animais controlo cuja dieta foi apenas suplementada com colestipol. Após o período de exposição, os ratos foram sacrificados e o conteúdo em alumínio dos sinaptossomas foi quantificado por AACG. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de pelo menos 3 determinações independentes. \*\*\*p < 0,01, significativamente diferente do grupo controlo crónico (Ctrl<sub>crónico</sub>).

O colestipol é uma resina que atravessa o organismo sem ser absorvida e exerce efeito no perfil lipoproteico (reduz o colesterol plasmático relativo às lipoproteínas de baixa densidade) por prevenção da reabsorção dos ácidos biliares (Gaw *et al.*, 1996).

Uma vez que tanto o alumínio como o colestipol foram administrados por via oral, foi investigado o efeito do colestipol na absorção de alumínio. Com este objectivo, foram recolhidas amostras de sangue, urina e fezes para quantificação de alumínio, antes e após a administração de AlCl<sub>3</sub> e colestipol. A concentração basal registada no sangue, urina e

fezes dos ratos foi  $< 6 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$ ,  $7 \pm 2 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  e  $149 \pm 26 \text{ mg Al}^{3+}/\text{Kg}$ , respectivamente. Embora se tenha detectado  $\text{Al}^{3+}$  nas amostras de sangue, as concentrações registadas foram demasiado baixas para possibilitarem uma análise quantitativa com nível de confiança aceitável. No entanto, foi possível medir o aumento transitório da concentração de alumínio no sangue após uma única administração oral de alumínio e o regresso à concentração basal após 6 horas. A administração de 0,03 g (dose crónica) e 1,00 g (dose sub-aguda) originou um aumento da concentração de alumínio no sangue superior a  $1 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  e  $108 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$ , respectivamente. A administração de colestipol não modificou os valores basais, nem o aumento transitório da concentração de alumínio no sangue. Concordantemente, o colestipol aumentou ligeiramente ( $\sim 6\%$ ) a quantidade de alumínio eliminada nas fezes durante os 4 dias subsequentes à administração de  $\text{AlCl}_3$ . No entanto, o colestipol produziu um aumento da quantidade total de alumínio excretada na urina de  $\sim 4,5$  vezes, o que provavelmente reflecte uma redução na retenção de alumínio no cérebro e/ou outros tecidos.

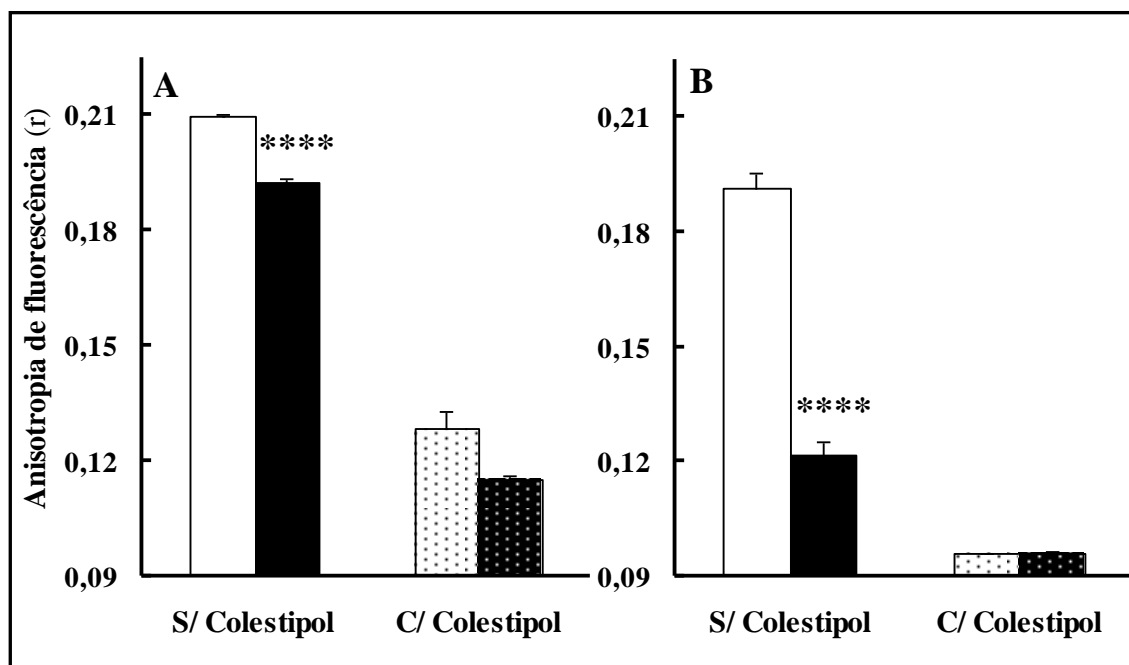
Os resultados descritos indicam que após a exposição *in vivo* a doses elevadas de alumínio na dieta, a acumulação deste metal nos terminais nervosos é menor quando os níveis de colesterol nos sinaptossomas são baixos. De facto, a ingestão de colestipol preveniu a elevação da razão molar de  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  sinaptossomal (Figura III.15,  $\text{Ctrl}_{\text{crónico}}$  e  $\text{Col}_{\text{crónico}}$ ) e conduziu a uma diminuição proporcional no conteúdo em alumínio dos sinaptossomas (Figura III.16,  $\text{Al}_{\text{crónico}}$  e  $\text{Al+Col}_{\text{crónico}}$ ).

### ***2.3. Efeito do colesterol nas alterações de fluidez de membrana dos terminais nervosos induzidas por alumínio após administração oral de alumínio***

Os mecanismos de transporte de alumínio através das biomembranas ainda não são totalmente conhecidos. O colesterol e os fosfolípidos constituem a “coluna vertebral” das biomembranas, conferindo fluidez e permeabilidade à membrana plasmática dos sinaptossomas. Para investigar o efeito do colesterol nas alterações de fluidez de membrana induzidas pelo alumínio, foi avaliado o efeito da exposição oral a colestipol e alumínio na fluidez de membrana em terminais nervosos isolados.



A Figura III.17 ilustra as alterações da fluidez de membrana dos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos expostos cronicamente a dieta contendo alumínio e colestipol. A administração *in vivo* de colestipol reduziu a anisotropia de fluorescência do DPH incorporado na membrana sinaptossomal de 0,21 para 0,13 (Figura III.17.A), indicando uma fluidificação das regiões hidrofóbicas da membrana durante o tratamento com colestipol. Este efeito foi ainda mais evidente (45%) quando os animais foram expostos concomitantemente a alumínio, que, por sua vez, induziu uma ligeira fluidificação (8%) ao nível da região hidrofóbica (Figura III.17.A). A exposição crónica a



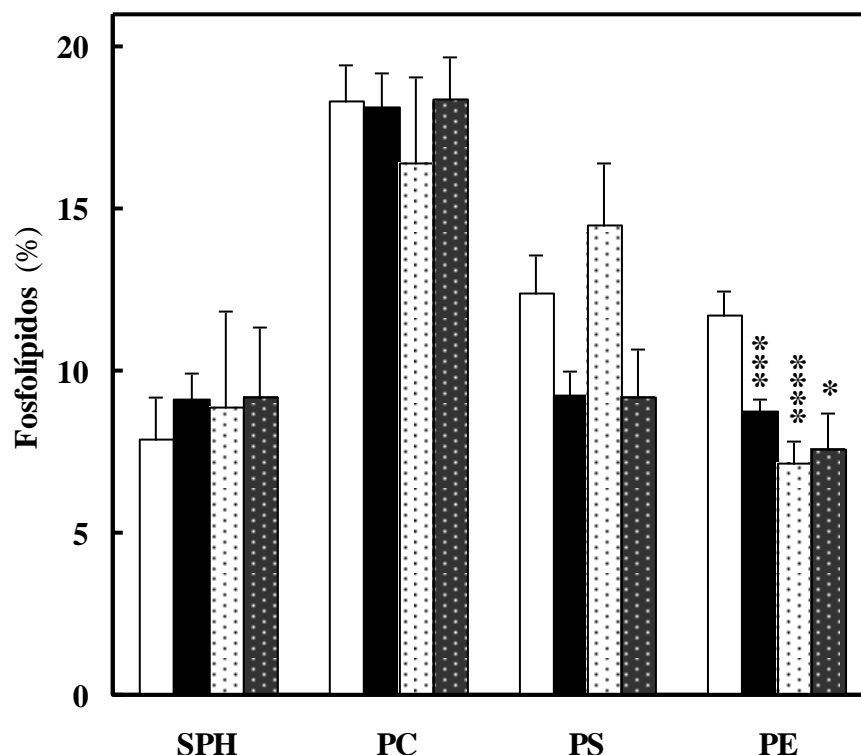
**Figura III.17. Efeito da exposição crónica *in vivo* de ratos a alumínio e colestipol na fluidez de membrana dos sinaptossomas.**

A dieta dos grupos Al<sub>crónico</sub> (■) e Al+Col<sub>crónico</sub> (■) foi suplementada, durante 4 meses, com 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> (S/ Colestipol) e com 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> mais 0,31 g/dia de colestipol (C/ Colestipol), respectivamente. Ctrl<sub>crónico</sub> (□) e Col<sub>crónico</sub> (▤) correspondem aos animais controlo, que foram mantidos *ad libitum* ou cuja dieta foi suplementada apenas com colestipol, respectivamente. Após o período de exposição, os ratos foram sacrificados e a fluidez de membrana dos sinaptossomas foi monitorizada pelo método fluorimétrico. As alterações da fluidez de membrana ao nível das regiões hidrofóbicas (**Painel A**) e ao nível das regiões hidrofílicas (**Painel B**) foram quantificadas, respectivamente, por anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de pelo menos 9 determinações independentes. \*\*\*\*p < 0,001, significativamente diferente do grupo controlo crónico (Ctrl<sub>crónico</sub>).

alumínio promoveu um aumento da fluidez da região hidrofílica, uma vez que a anisotropia de fluorescência do TMA-DPH diminuiu de 0,19 para 0,12 (Figura III.17.B). A administração do colestipol durante a exposição a alumínio não preveniu as alterações induzidas pelo alumínio na fluidez de membrana. Tal como pode ser observado na Figura III.17.B, o colestipol foi mais eficiente na redução da anisotropia de fluorescência do TMA-DPH (de 0,19 para 0,09) do que o alumínio (de 0,19 para 0,12). Por conseguinte, a administração de colestipol, que diminuiu a razão molar CH/PL<sub>totais</sub> sinaptossomal (Figura III.15) e preveniu a acumulação de alumínio (Figura III.16.B), aumentou a fluidez da membrana sinaptossomal, mas não modificou as alterações induzidas neste parâmetro pela exposição *in vivo* a alumínio.

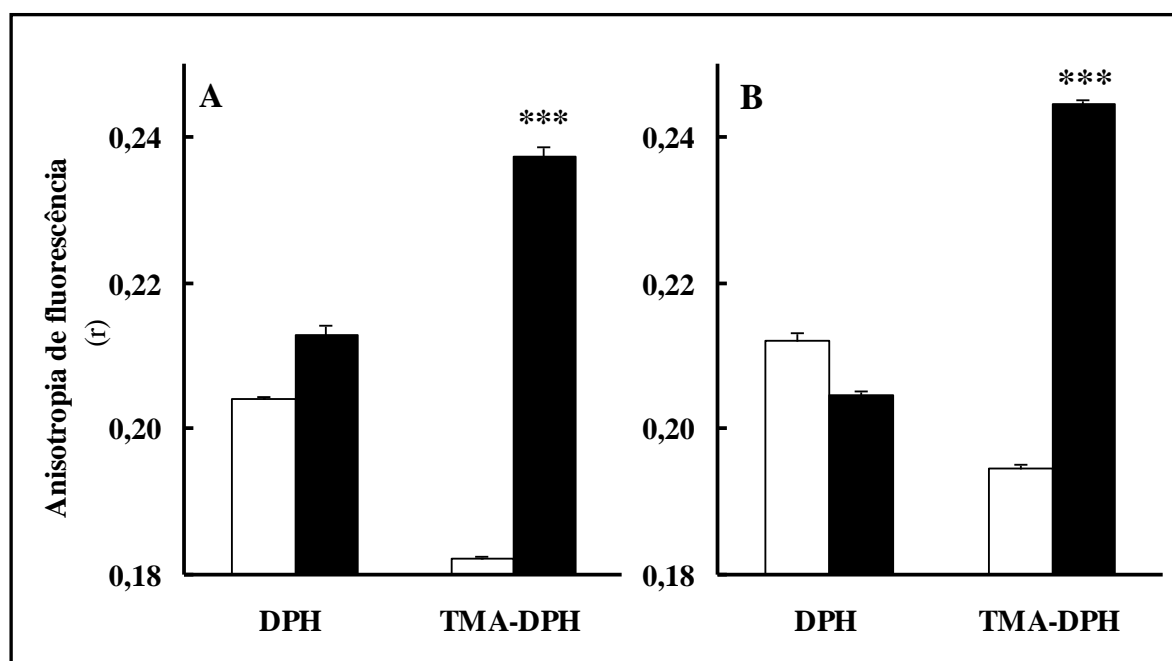
A análise cromatográfica das principais classes de fosfolípidos membranares revelou que a exposição a alumínio reduziu (25%) a razão fosfatidiletanolamina/fosfolípidos totais, enquanto que a maioria das classes de fosfolípidos permaneceu inalterada (Figura III.18). Consequentemente, a razão fosfatidilserina/fosfatidiletanolamina (PS/PE) das membranas sinaptossomais isoladas a partir do córtex cerebral dos ratos expostos a alumínio (1,2) parece ligeiramente aumentada quando comparada com o valor obtido para o grupo controlo (0,9). Após a administração de colestipol os níveis de esfingomiélin, fosfatidilcolina e fosfatidilserina permaneceram inalterados, enquanto que a fosfatidiletanolamina sofreu uma redução de 39% após a administração prolongada de colestipol. Os efeitos induzidos pelo colestipol e alumínio na percentagem relativa de fosfatidiletanolamina da membrana sinaptossomal, parece ser mediada pelo mesmo mecanismo, uma vez que a administração concomitante das duas substâncias não produziu uma maior redução (35%) da razão fosfatidiletanolamina/fosfolípidos totais.

É interessante notar que após incubação *in vitro* com AlCl<sub>3</sub>, os sinaptossomas, isolados a partir de animais não expostos a alumínio, apresentaram regiões hidrofílicas mais rígidas (visualizadas pelo TMA-DPH), sem alteração da fluidez de membrana ao nível das regiões hidrofóbicas (visualizadas pelo DPH) (Figura III.19).



**Figura III.18. Efeito da exposição crónica *in vivo* a alumínio e colestipol nas principais classes de fosfolípidos da membrana sinaptossomal.**

A dieta dos grupos Al<sub>crónico</sub> (■), Col<sub>crónico</sub> (▤) e Al+Col<sub>crónico</sub> (▨) foi suplementada, durante 4 meses, com 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub>, 0,31 g/dia de colestipol e 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> mais 0,31 g/dia de colestipol, respectivamente. O grupo Ctrl<sub>chronic</sub> (□) corresponde aos animais controlo. Após o período de exposição, os ratos foram sacrificados e foi quantificado o conteúdo sinaptossomal em esfingomielina (SPH), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE). Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 9 determinações independentes. \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,001, significativamente diferente do grupo controlo crónico (Ctrl<sub>crónico</sub>).



**Figura III.19. Efeito *in vitro* da incubação de alumínio na fluidez da membrana de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato.**

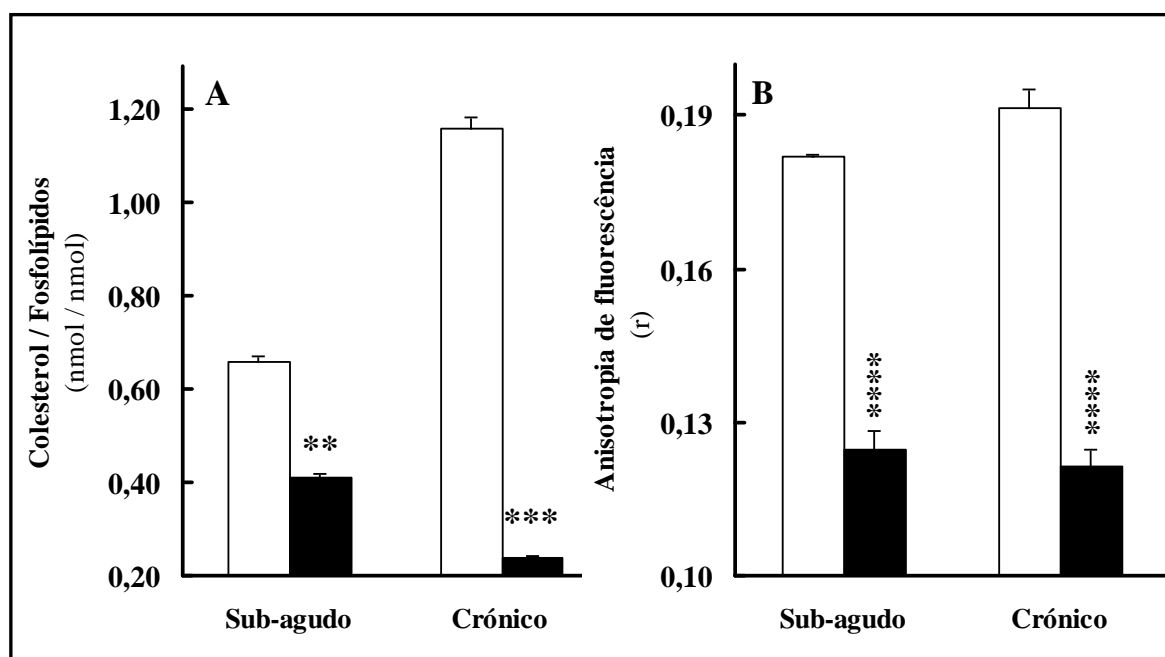
Os ratos dos grupos Ctrl<sub>sub-agudo</sub> e Ctrl<sub>crônico</sub> (□) foram mantidos *ad libitum* durante 10 dias (**Painel A**) e 4 meses (**Painel B**), respectivamente. Incubaram-se sinaptossomas (0,25 mg proteína/ml) a 30°C, em meio contendo NaCl 132 mM, KCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glucose 10 mM e HEPES-Na 10 mM a pH 7,4, na ausência (□) e na presença de AlCl<sub>3</sub> 75 μM (■). Após 15 min., o meio de incubação foi removido por centrifugação a 14.000 rpm e a fluidez de membrana foi monitorizada nos sinaptossomas sedimentados. As alterações da fluidez de membranas ao nível da região hidrofóbica e hidrofílica foram quantificadas pela anisotropia de fluorescência do DPH (DPH) e TMA-DPH (TMA-DPH), respectivamente. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão da média de pelo menos 9 determinações independentes. \*\*\*p < 0,01, significativamente diferente do grupo controlo sub-agudo (Ctrl<sub>sub-agudo</sub>) ou controlo crónico (Ctrl<sub>crônico</sub>), respectivamente.

O efeito *in vitro* do AlCl<sub>3</sub> é dependente da concentração (resultados não apresentados), tendo sido máximo para concentrações de AlCl<sub>3</sub> superiores ou iguais a 75 μM no meio de incubação. Este efeito parece ser insensível à razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> da membrana sinaptossomal, uma vez que a anisotropia de fluorescência do TMA-DPH aumentou na mesma proporção (0,05) que a verificada quando foram usados sinaptossomas isolados a partir de ratos com razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> igual a 0,7 (animais controlo do protocolo sub-agudo) (Figura III.19.A) ou com razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> igual a 1,2 (animais controlo do protocolo crónico) (Figura III.19.B).

Por outro lado, a razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos, após exposição sub-aguda e crónica, foi de 0,4 e 0,2, respectivamente (Figura III.20.A), correspondendo a uma diminuição de ~38% e ~80%, respectivamente. Estes resultados indicam que a administração de alumínio *in vivo* foi acompanhada pela redução significativa da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> dos terminais nervosos sinápticos.

Tal como se pode observar na Figura III.20, a diminuição da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> induzida pela administração *in vivo* de alumínio (Figura III.20.A) parece correlacionar-se com o aumento da fluidez das regiões hidrofílicas induzido pela acumulação de alumínio nos sinaptossomas (Figura III.20.B). De facto, observou-se uma fluidificação significativa (~34%) da região hidrofílica da membrana de sinaptossomas isolados a partir de ratos expostos *in vivo* a alumínio.

Os resultados apresentados sugerem que, em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato após ingestão de alumínio, a capacidade de acumulação de alumínio correlaciona-se com as alterações na composição da membrana em colesterol e com os parâmetros de ordem dos lípidos, que por sua vez dependem do conteúdo em alumínio dos sinaptossomas. São apresentadas duas linhas de evidências de que a susceptibilidade à intoxicação por alumínio na dieta pode ser condicionada pelo colesterol. A primeira mostra que níveis baixos da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> estão relacionados com a redução da acumulação de alumínio nos terminais nervosos do córtex cerebral do rato (Figuras III.15 e III.16). A segunda mostra que a diminuição da ordem da membrana sináptica plasmática (Figuras III.17 e III.19.B) está mais associada à redução da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> (Figura III.19.A), do que a alterações da composição fosfolipídica da membrana (Figura III.18) ou à interacção directa do alumínio com grupos carregados negativamente presentes na membrana plasmática pré-sináptica (Figura III.19).



**Figura III.20. Efeito *in vivo* do alumínio na razão molar de colesterol/fosfolípidos totais e na fluidez da membrana dos sinaptossomas.**

A dieta dos grupos Al<sub>sub-agudo</sub> e Al<sub>crônico</sub> (■) foi suplementada com 1,00 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 10 dias (Sub-agudo) e 0,03 g/dia de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses (Crônico), respectivamente. Os grupos Ctrl<sub>sub-agudo</sub> e Ctrl<sub>crônico</sub> (□) correspondem aos animais controle. Após o período de exposição, foram isolados sinaptossomas e procedeu-se à quantificação da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> (**Painel A**) e à fluidez da membrana ao nível das regiões hidrofílicas (TMA-DPH) (**Painel B**). Os valores são apresentados como a média ± o desvio padrão da média de pelo menos 10 determinações independentes. \*\*p < 0,02; \*\*\*p < 0,01 (**Painel A**) e \*\*\*\*p < 0,001 (**Painel B**), significativamente diferente do grupo controle sub-agudo (Ctrl<sub>sub-agudo</sub>) ou controle crônico (Ctrl<sub>crônico</sub>), respectivamente.

### 3. Efeito do alumínio na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal

A capacidade do alumínio modificar a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase tem sido observada por vários investigadores (Lai *et al.*, 1980a; King *et al.*, 1983; Caspers *et al.*, 1990; 1993; 1994; Rao, 1990; 1992; Lal *et al.*, 1993; Zatta *et al.*, 1995; Sarin *et al.*, 1997b). Na literatura o que se encontra relatado com mais frequência é que na presença de alumínio a actividade de ATPase é inibida, tal como foi observado nas nossas condições experimentais (Figura III.13). Contudo, também foi observado por alguns investigadores a

activação desta enzima (Zatta *et al.*, 1995). No entanto, o mecanismo de acção do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  permanece por explicar.

Este estudo foi empreendido com o objectivo de compreender o mecanismo de acção inibitória do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Inicialmente, determinou-se se a exposição *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  induziam modificações semelhantes na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  localizada nos terminais nervosos de córtex cerebral de rato, estudando o mecanismo de acção do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de sinaptossomas isolados a partir de ratos expostos a dieta contendo  $\text{AlCl}_3$  (exposição *in vivo* a 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$ ) e de sinaptossomas incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$  (exposição *in vitro*). Seguidamente, determinou-se se a exposição *in vivo* a alumínio está associada a alterações específicas na actividade e expressão das isoenzimas da proteína membrana  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

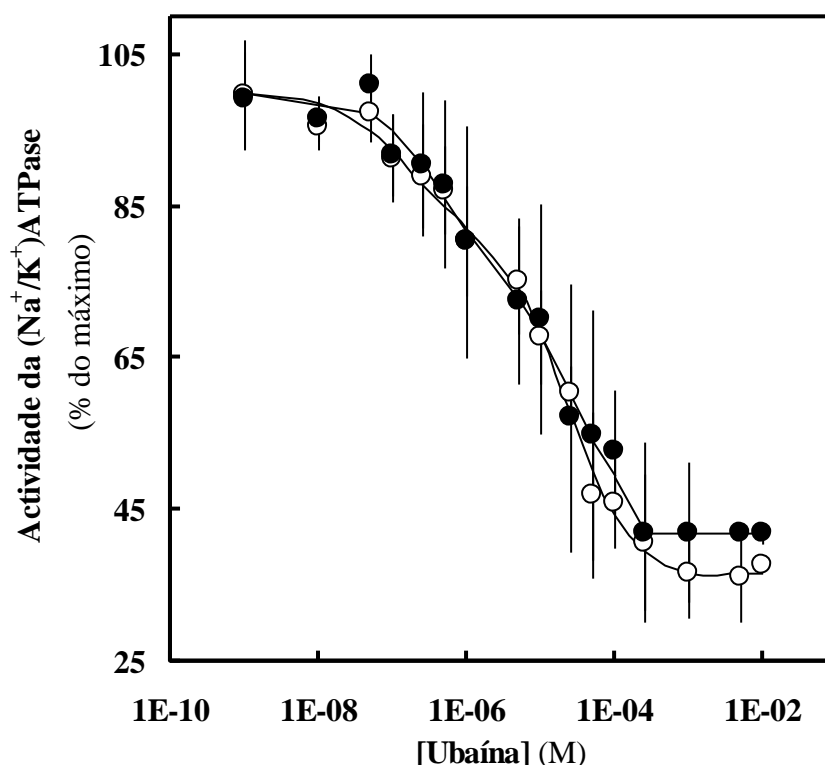
### ***3.1. Efeito da exposição in vitro a alumínio na actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$***

A ubaína é o inibidor mais utilizado para distinguir a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (EC 3.6.3.9) da actividade de outras fosfohidrolases (Skou, 1989, 1990). A Figura III.21 mostra a dependência da actividade de fosfohidrolase de ATP em função da concentração de ubaína presente no meio de reacção.

Como se pode observar, a curva de “dose-resposta” da inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por ubaína apresentou o perfil típico, actualmente interpretado como reflectindo a presença, no tecido nervoso, de três isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  com sensibilidades distintas à ubaína (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1994). Consequentemente, parece que a presença *in vitro* de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  não modificou a sensibilidade à ubaína da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal. De forma similar, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de ubaína necessárias para inibir completamente a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (> 1 mM) na ausência e na presença de alumínio no meio de reacção (Figura III.21). Por conseguinte, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi calculada como a diferença entre a actividade de  $\text{ATPase}$  na ausência e na presença de ubaína 5 mM.

A actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , sensível a ubaína, de sinaptossomas, isolados a partir de córtex cerebral de rato e congelados em azoto líquido e descongelados à

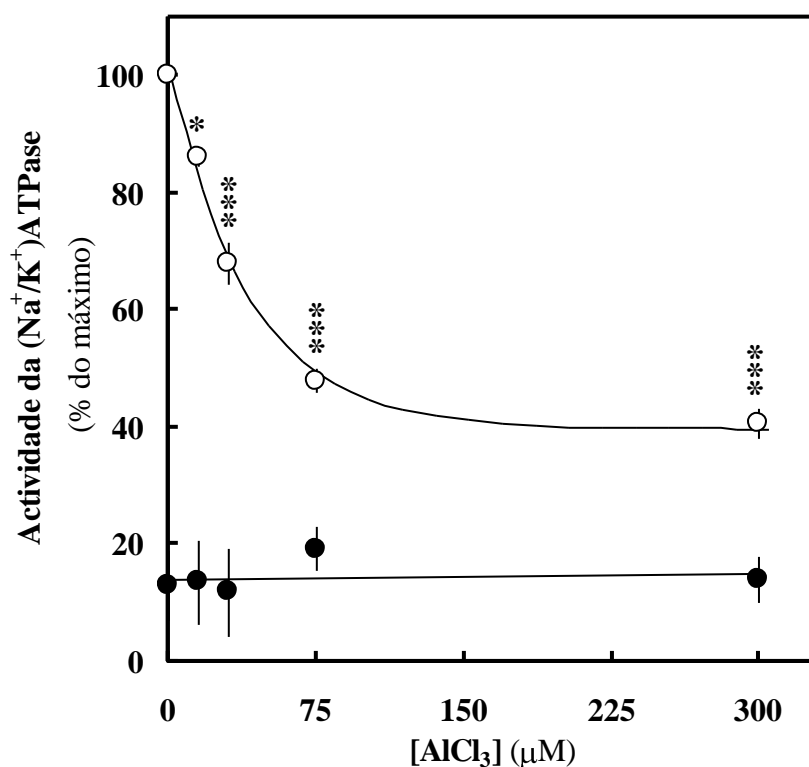
temperatura ambiente, foi inibida por  $\text{AlCl}_3$ , de uma forma dependente da sua concentração no meio de reacção (Figura III.22). Na presença de Mg-ATP 500  $\mu\text{M}$ , que nestas condições experimentais corresponde à concentração de substrato saturante, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi inibida maximamente (~60%) por  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ . Na presença de  $\text{AlCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  foi observada uma inibição significativa ( $p < 0,01$ ) de 30% e para concentrações de  $\text{AlCl}_3$  superiores a 75  $\mu\text{M}$  foi observado um efeito inibitório quase máximo.



**Figura III.21. Efeito da exposição *in vitro* a alumínio na inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por ubaína.**

Os sinaptossomas (0,1 mg proteína/ml) foram incubados durante 5 min, a 35°C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 100  $\mu\text{M}$  e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e ubaína (0 - 10 mM). As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP de forma a obter uma concentração final de 500  $\mu\text{M}$  na ausência (○-○) e na presença (●-●) de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ . A reacção foi finalizada após 5 min e o  $\text{P}_i$  produzido foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores são expressos como a percentagem máxima de actividade na ausência de ubaína, e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes.



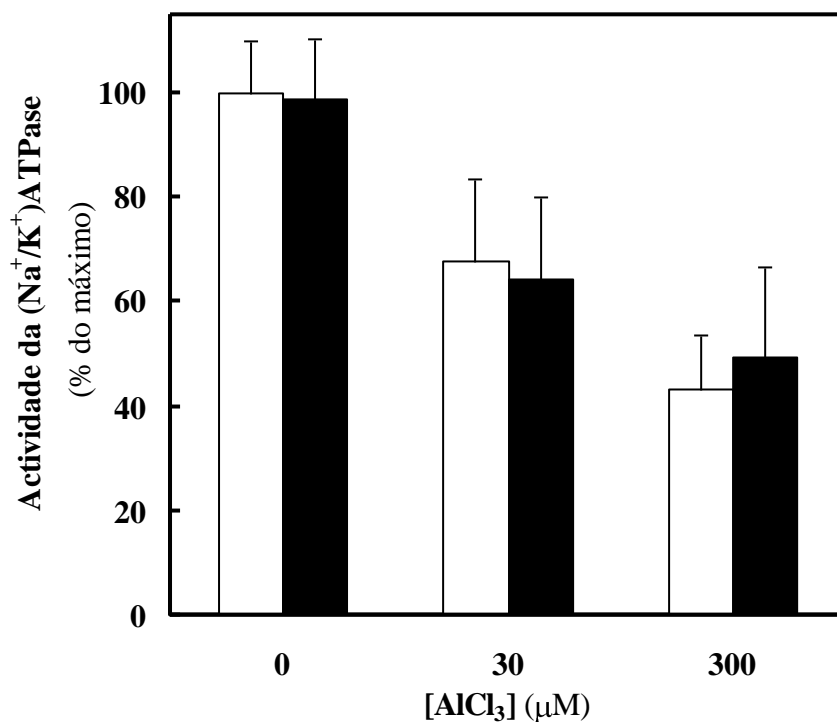


**Figura III.22. Efeito da exposição *in vitro* a alumínio na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase.**

Os alíquotas de sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 5 min, a 35°C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 100 μM e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4), na ausência e na presença de concentrações crescentes de AlCl<sub>3</sub> (0 - 300 μM). As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP de forma a obter uma concentração final de 500 μM (○-○) ou 5 μM (●-●). As reacções foram finalizadas após 5 min e a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase foi determinada tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão de 6 determinações independentes. \*p < 0,05 e \*\*\*p < 0,01.

É interessante notar que a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase não foi inibida por AlCl<sub>3</sub> na presença de concentrações baixas (5 μM), não saturantes, de Mg-ATP (Figura III.22, linha ●-●). O facto do ATP poder ligar alumínio com afinidade mais elevada do que o magnésio (Martin, 1986; van Rensburg *et al.*, 1997) não significa que o complexo Al-ATP compita com o Mg-ATP na ligação ao sítio catalítico da enzima. De facto, nas nossas condições experimentais, a inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase induzida pelo AlCl<sub>3</sub> permaneceu inalterada,

quando a concentração de  $\text{MgCl}_2$  no meio de incubação foi aumentada para 60 mM (Figura III.23).



**Figura III.23. Efeito do  $\text{Mg}^{2+}$  na inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida por alumínio.**

As condições experimentais são semelhantes às descritas na legenda da Figura III.22, à exceção das reacções terem sido iniciadas pela adição de  $\text{Mg-ATP}$  (concentração final de 500  $\mu\text{M}$ ) e decorreram na presença de  $\text{MgCl}_2$  10 mM (□) ou 60 mM (■). Os valores são expressos como a percentagem da actividade máxima e apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes.

Assim, na presença de  $\text{AlCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  foi observada uma inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de ~30 %, quer na presença de  $\text{MgCl}_2$  10 mM quer na presença de  $\text{MgCl}_2$  60 mM. Para a concentração correspondente a um efeito inibitório da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  máximo ( $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ ), não se registaram alterações significativas da capacidade inibitória (~60%), quer na presença de  $\text{MgCl}_2$  10 mM, quer na presença de  $\text{MgCl}_2$  60 mM. Estes resultados foram obtidos na presença de concentrações de substrato saturantes ( $[\text{ATP}] = 500 \mu\text{M}$ ) (Figura III.22, linha ○-○).

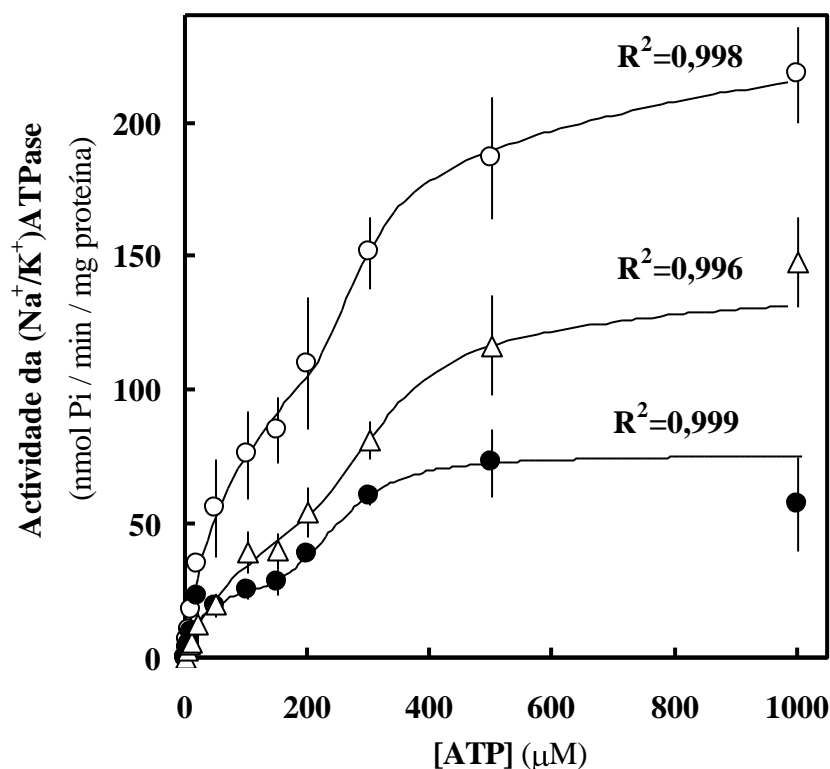
### 3.2. Efeito da exposição a alumínio na actividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em função da concentração de substrato

A Figura III.24 representa a dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal em função da concentração de Mg-ATP. Pode observar-se que esta dependência se afastou do padrão hiperbólico, exibindo um “plateau” intermédio (Figura III.24, linha  $\circ-\circ$ ), o que está de acordo com dados cinéticos anteriores relativos à cooperatividade na interacção do ATP com a enzima enquanto proteína integral da membrana. A Figura III.24 (curva  $\circ-\circ$ ) mostra também os efeitos da interacção de ATP de alta afinidade (cooperatividade negativa) e de baixa afinidade (cooperatividade positiva).

A incubação *in vitro* de sinaptossomas, previamente congelados/descongelados, com  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ , concentração que promoveu a inibição máxima (Figura III.22), reduziu drasticamente a activação da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , induzida por concentrações elevadas de Mg-ATP ( $> 150 \mu\text{M}$ ). No entanto, na gama de baixas concentrações de Mg-ATP ( $< 20 \mu\text{M}$ ), a dependência de substrato da actividade enzimática permaneceu inalterada (Figura III.24, curva  $\bullet-\bullet$ ). Os ensaios relativos à dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP efectuados com sinaptossomas, congelados/descongelados, isolados a partir de córtex cerebral de ratos que ingeriram 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$ , revelaram que a exposição crónica *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  parece ter produzido uma modificação idêntica no comportamento cinético da enzima (Figura III.24, curva  $\Delta-\Delta$ ).

Após exposição crónica a  $\text{AlCl}_3$ , a curva da dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP (Figura III.24, curva  $\Delta-\Delta$ ) coincidiu com a curva da dependência de substrato na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  na gama de concentrações de Mg-ATP inferiores a 75  $\mu\text{M}$  (Figura III.24, curva  $\bullet-\bullet$ ) e exibiu menor redução da activação da enzima por elevadas concentrações de Mg ATP ( $> 150 \mu\text{M}$ ). Ainda assim, na presença de concentrações saturantes de substrato ( $> 500 \mu\text{M}$  ATP), a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi inibida significativamente ( $\sim 32\%$ ). É importante notar que, nestas condições experimentais, a redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  reflectiu a acção do alumínio durante o período de exposição *in vivo*, uma vez que não foi adicionado  $\text{AlCl}_3$  ao meio de reacção. De facto, a exposição diária a 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$

durante 4 meses causou acumulação de  $\text{Al}^{3+}$  na fracção sinaptossomal ( $7,1 \text{ Al}^{3+} \text{ ng/ mg}$  proteína), que correspondeu a um aumento do conteúdo em  $\text{Al}^{3+}$  de 1,7 vezes relativamente ao valor do grupo controlo (Figura III.7). A redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  dos sinaptossomas, previamente congelados/descongelados e isolados a partir do córtex cerebral dos ratos pertencentes ao grupo de exposição a alumínio, parece confirmar que, nas nossas condições experimentais, a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida por  $\text{AlCl}_3$  não pode ser atribuída à formação do complexo  $\text{Al-ATP}$  (Figura III.23).



**Figura III.24. Efeito da exposição a alumínio na dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP.**

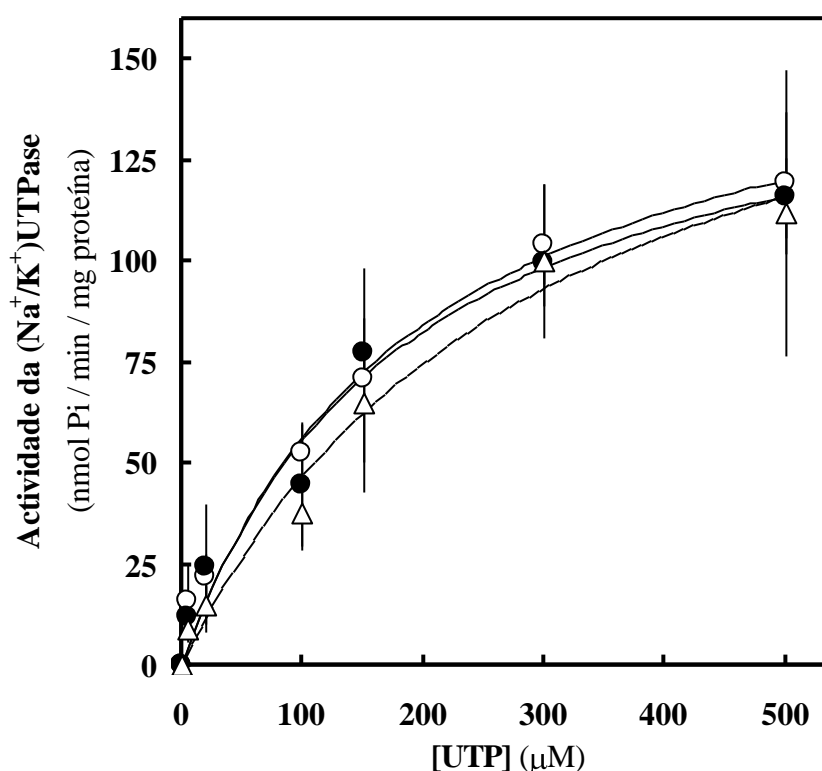
As condições experimentais são semelhantes às descritas na legenda da Figura III.22, à excepção da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  ter sido medida na presença de concentrações crescentes de ATP (até 1000  $\mu\text{M}$ ). ( $\circ-\circ$ ), Condição controlo (sinaptossomas isolados a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo); ( $\bullet-\bullet$ ), exposição *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  (sinaptossomas incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  durante 5 min.); e ( $\Delta-\Delta$ ), a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  (sinaptossomas isolados a partir de ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes. As curvas representam as funções ajustadas, tal como descrito em “Materiais e métodos” [Equação 3], que correspondem a uma modificação da equação inicialmente proposta por Boldyrev e colaboradores (Boldyrev *et al.*, 1991; Boldyrev & Kurella, 1996).

Com o objectivo de caracterizar o mecanismo do efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal, os dados experimentais obtidos nos ensaios relativos à dependência da concentração de ATP foram usados para ajustar a curva bifásica descrita pela Equação 3 (ver “Materiais e métodos”), que corresponde à modificação da equação inicialmente proposta por Boldyrev e colaboradores (Boldyrev *et al.*, 1991; Boldyrev & Kurella, 1996). Uma vez que os dados gerados pela função ajustada foram comparáveis aos valores obtidos experimentalmente, os parâmetros de ajuste foram considerados como correspondendo aos parâmetros cinéticos da reacção hidrolítica catalisada pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na presença da gama de baixas e altas concentrações de Mg-ATP.

Verificou-se que o valor de  $n_H$  (coeficiente de Hill da reacção hidrolítica) permaneceu inalterado após a exposição a  $\text{AlCl}_3$ , apresentando valores de 0,7 (condições controlo), 0,8 (exposição *in vitro* a 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ ) e 0,8 (exposição *in vivo* a 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses). Contrariamente, os valores de  $n$  (número máximo de protómeros que interagem no conjunto oligomérico) foram alterados significativamente após exposição *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$ . A exposição a alumínio induziu uma diminuição do valor de  $n$  de 1,5 vezes, tendo sido obtidos valores de 8,0 (condições controlo), 5,5 (exposição *in vitro*) e 5,4 (exposição *in vivo*). Por outro lado, na condição controlo a reacção da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  decorreu a uma  $V_{\text{máx}}$  (velocidade máxima da reacção global) de 281 nmol Pi/min/mg proteína, enquanto que após exposição *in vitro* e *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  estes valores foram de 78 e 154 nmol Pi/min/mg de proteína, respectivamente. Os resultados obtidos parecem indicar que, nestas condições experimentais, o alumínio pode interferir com o passo limitante da reacção global de ATPase na presença de concentrações de ATP não limitantes e com as interacções inter-protoméricas estabelecidas no seio do conjunto oligomérico da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , estado este característico da enzima quando integrada na membrana plasmática.

Uma vez que apenas os nucleótidos contendo adenina e cisteína podem promover activação adicional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , através da interacção com os locais de ligação dos nucleótidos de alta e baixa afinidade (Boldyrev & Svinukhova, 1982; Thoenges *et al.*, 1999), foi testado se a incubação de sinaptossomas com  $\text{AlCl}_3$  altera a dependência da enzima em função da concentração do substrato, quando o UTP (um “mau” substituto do ATP na activação de baixa afinidade) é usado como substrato hidrolítico.

Tal como pode ser observado na Figura III.25, quando o UTP foi usado em substituição do ATP, não foi observada cooperatividade positiva numa gama alargada de concentrações de substrato e o curso da reacção enzimática permaneceu inalterado na presença de  $\text{AlCl}_3$ . Estes resultados estão de acordo com os apresentados nas Figuras III.22 e III.24, onde o efeito inibitório do alumínio não foi observado na presença de baixas concentrações de ATP, e, desse modo, constitui uma evidência adicional da interferência



**Figura III.25. Efeito da exposição *in vitro* a alumínio na dependência da actividade UTPásica sensível a ubaína em função da concentração de UTP.**

A actividade da UTPase foi medida na presença de concentrações crescentes de UTP (0 - 500  $\mu\text{M}$ ), tal como descrito na legenda da Figura III.24. (○-○), condição controlo (sinaptossomas isolados a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo); (●-●), exposição *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  (sinaptossomas incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  durante 5 min) e (Δ-Δ), exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  (sinaptossomas isolados a partir de ratos que ingeriram diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes.

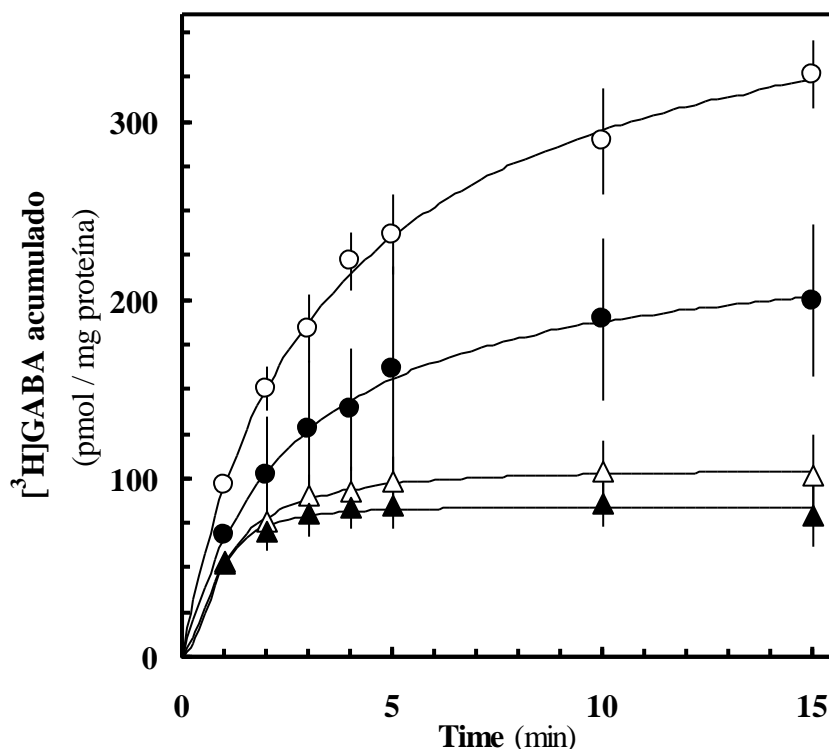
do alumínio com a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  ao nível dos locais de ligação de baixa afinidade mais do que ao nível do passo de fosforilação da enzima, que requer baixas concentrações de ATP e ocorre na presença de UTP.

Apesar do mecanismo exacto subjacente à redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida pelo  $\text{AlCl}_3$  não estar completamente descrito, estes resultados demonstram claramente que ambas as exposições a alumínio, *in vivo* e *in vitro*, produziram apenas uma inibição parcial da actividade da enzima na presença de elevadas concentrações de ATP ( $> 150 \mu\text{M}$ ), enquanto que para baixas concentrações de ATP ( $< 20 \mu\text{M}$ ) ou quando o UTP foi usado como substrato a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  não foi inibida. Adicionalmente, as exposições *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  diminuíram o número de protómeros que interagem (Figura III.24), o que parece indicar que em sinaptossomas, previamente congelados e descongelados, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  encontra-se principalmente no estado de elevada oligomerização (octómero) e na presença de  $\text{AlCl}_3$  predomina a forma tetraprotomérica.

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é a proteína integral da membrana plasmática que transporta  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  contra os seus gradientes electroquímicos mercê da energia libertada durante a hidrólise de ATP (transporte activo primário). Os resultados apresentados reflectem a acção inibitória do alumínio na actividade hidrolítica de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , não fornecendo qualquer evidência experimental relativamente ao seu efeito na actividade de transporte.

A Figura III.26 representa a acumulação de GABA por sinaptossomas intactos, não submetidos a congelamento e descongelamento, isolados a partir de córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo. Tal como referido anteriormente, o transporte activo de GABA requer o gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  como fonte de energia. Deste modo, a inibição da actividade de transporte da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  deve comprometer o transporte de GABA. Tal como pode ser observado na Figura III.26, quando sinaptossomas intactos foram incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$   $300 \mu\text{M}$  registou-se uma redução acentuada (38%) da quantidade de GABA acumulado durante 15 min. Um efeito inibitório mais acentuado (69%) foi produzido por ubaína  $50 \mu\text{M}$ , que nas condições experimentais usadas para medir a actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , reduziu a actividade enzimática em 70% (Figura III.21). Além do mais, verificou-se que na presença simultânea de  $\text{AlCl}_3$   $300 \mu\text{M}$  e ubaína  $50 \mu\text{M}$  no meio de incubação, a extensão de redução máxima da acumulação de GABA permaneceu praticamente inalterada. Estes resultados sugerem que o efeito

inibitório do alumínio na ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase é exercido tanto ao nível da actividade hidrolítica como da actividade de transporte.



**Figura III.26. Efeito da exposição *in vitro* a alumínio e a ubaína na acumulação de GABA pelos sinaptossomas intactos.**

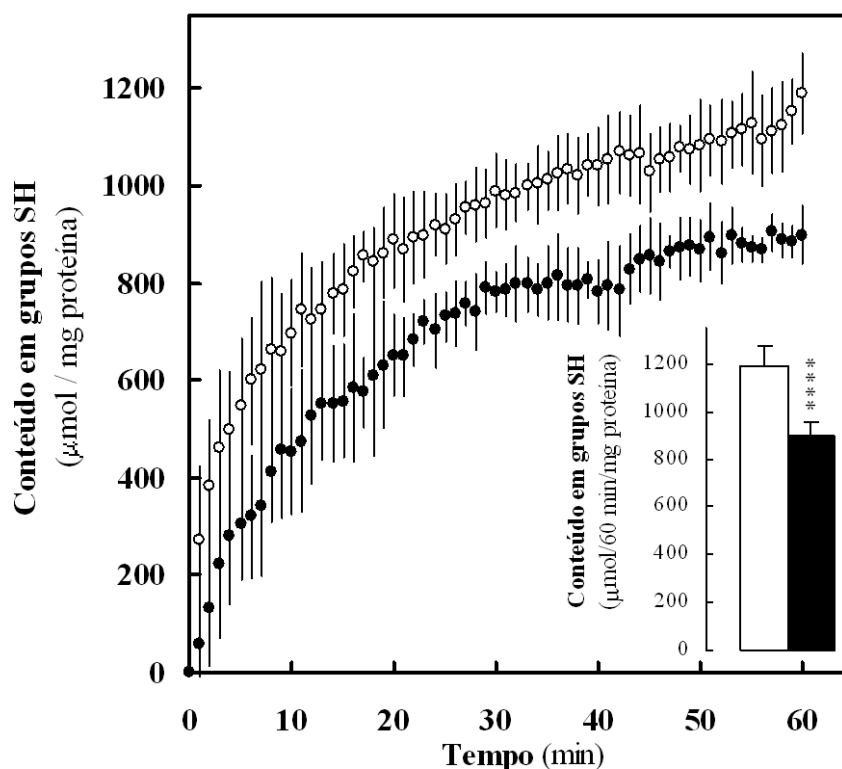
A acumulação de GABA foi quantificada em sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos, cuja dieta não continha alumínio adicionado (Controlo ○-○) e em sinaptossomas incubados durante 15 min na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  (●-●), na presença de ubaína 50  $\mu\text{M}$  (△-△) e na presença simultânea de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  e ubaína 50  $\mu\text{M}$  (▲-▲). Os sinaptossomas (0,5 mg de proteína/ml) foram adicionados ao meio de reacção contendo [ $^3\text{H}$ ]GABA 0,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM, NaCl 128 mM, KCl 5 mM, AOAA 10  $\mu\text{M}$ , glicose 10 mM, EGTA 0,1 mM e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4). As reacções decorreram a 30°C e foram finalizadas por filtração rápida sob vácuo. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média de 5 determinações independentes.

Anteriormente foi observada a existência de correlação temporal entre o desenvolvimento dos processos de inibição da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase do cérebro e do rim por espécies reactivas de oxigénio e de diminuição do número de grupos SH da enzima (Boldyrev *et al.*, 1997; Kurella *et al.*, 1999). Durante a referida inibição da



( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase foram também observadas alterações nos parâmetros cinéticos, consistentes com quebra da interação protômero-protômero.

A Figura III.27 mostra que a incubação dos sinaptossomas, previamente congelados e descongelados, com  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  produziu uma redução ligeira (~24%) mas muito significativa ( $p < 0,001$ ) da concentração de grupos SH determinada pela reacção



**Figura III.27. Efeito da exposição *in vitro* a alumínio no conteúdo dos sinaptossomas em grupos SH.**

Os sinaptossomas (0,1 mg proteína/ml) foram incubados a 35°C num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 100  $\mu\text{M}$  e HEPES-Na 10 mM (pH 7.4), na ausência (○-○) e na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  (●-●). As reacções foram iniciadas pela adição de DTNB 600  $\mu\text{M}$  e as alterações de absorvância foram registadas ao longo de 60 min, a 412 nm, num espectrofotómetro em regime de duplo feixe, tal como descrito previamente. A concentração dos grupos SH nos sinaptossomas foi calculada considerando o valor do coeficiente decimal de absorção molar do tionitrobenzoato ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes. O gráfico incluso representa o conteúdo dos sinaptossomas em grupos SH incubados na ausência (□) e na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  (■) após 60 min de reacção com DTNB. \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

colorimétrica com DTNB. Em virtude dos grupos SH terem sido quantificados em sinaptossomas, estes resultados devem ser interpretados apenas como indicativos da capacidade do  $\text{AlCl}_3$  para diminuir o número de grupos sulfidrilo reactivos acessíveis ao DTNB e não como uma evidência directa da ocorrência de oxidação, induzida por  $\text{AlCl}_3$ , dos resíduos de cisteína envolvidos nas interações interprotoméricas no seio dos complexos oligoméricos que caracterizam a estrutura quaternária da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

Independentemente do mecanismo exacto responsável pela alteração da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida por  $\text{AlCl}_3$ , este trabalho demonstra claramente que a exposição *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  reduz drasticamente a activação adicional por concentrações elevadas de ATP da enzima modificada.

### ***3.3. Efeito da exposição crónica a alumínio na actividade e expressão de isoenzimas da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$***

O ajustamento da expressão da enzima  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e da sua actividade a alterações fisiológicas é assegurada por uma variedade de mecanismos de regulação, que englobam rápidas modificações pós-translacionais e alterações do complexo perfil celular de isoenzimas (ver Blanco & Mercer, 1998; Mobasheri *et al.*, 2000; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Cornelius & Mahmoud, 2003; Jorgensen *et al.*, 2003; para revisões recentes).

O objectivo deste estudo foi determinar se a exposição *in vivo* a alumínio promove alterações específicas na actividade e expressão das diferentes isoenzimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  presente nos terminais pré-sinápticos do córtex cerebral do rato.

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é composta por quantidades estequiométricas de dois polipeptídeos obrigatórios, a subunidade  $\alpha$  (~112 kDa) e a subunidade  $\beta$  (~45 kDa). Os locais de ligação para ATP, catiões e ubaína estão localizados na subunidade  $\alpha$ , que é responsável pela actividade catalítica da enzima. Três isoformas distintas da subunidade  $\alpha$  foram identificadas no sistema nervoso central dos vertebrados (Sweadner, 1992; Mobasheri *et al.*, 2000).

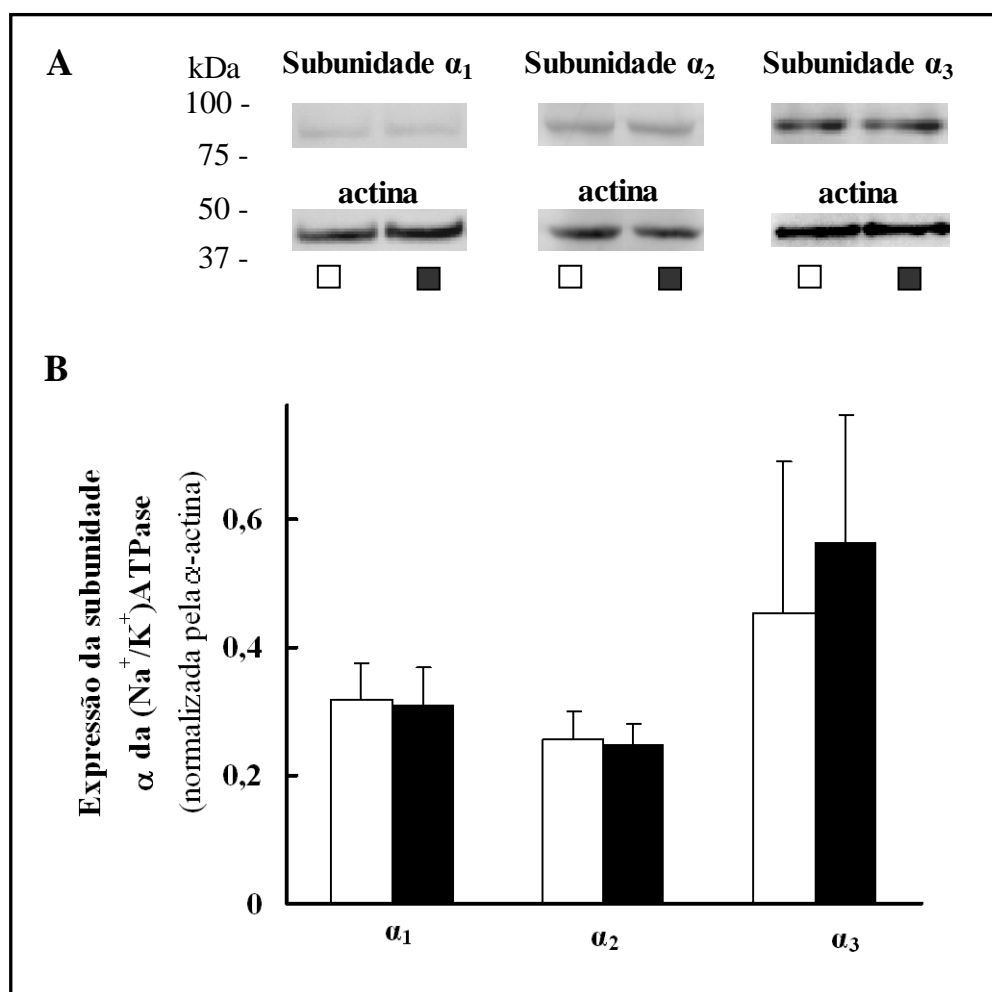
Para confirmar a expressão das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na fracção sinaptossomal de cérebro de rato (Foley & Linnoila, 1993), foram usados neste

estudo três anticorpos contra a subunidade catalítica, nomeadamente os anticorpos policlonais anti-NASE, anti-HERED e anti-TED, produzidos em coelho, contra as sequências NASE (KNPNASEPKHLL), HERED (KHEREDSPQSHVL) e TED (KHETEDPNDNRYL), que são específicas, respectivamente, das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de rato (Pressley, 1992). A imunodeteção nos extractos proteicos sinaptossomais revelou a presença das três isoformas da subunidade  $\alpha$ , uma vez que os referidos anticorpos reconheceram especificamente três bandas com pesos moleculares relativos de 93 kDa (subunidade  $\alpha_1$ ), 92 kDa (subunidade  $\alpha_2$ ) e 98 kDa (subunidade  $\alpha_3$ ) (Figura III.28).

As subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  também são habitualmente distinguidas por possuírem sensibilidades diferentes a ubaína (Blanco & Mercer, 1998). Por conseguinte, a presença das três isoformas da subunidade  $\alpha$  na fracção sinaptossomal foi também verificada pelo estabelecimento da dependência da actividade hidrolítica de ATP em função da concentração de ubaína presente no meio de reacção (Figura III.29.A). A curva de “dose-resposta” relativa à inibição por ubaína da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  apresentou o perfil característico, normalmente interpretado como o reflexo da presença, no tecido nervoso, de três subunidades  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  com sensibilidades distintas a ubaína.

Com o objectivo de discriminar as sensibilidade a ubaína das isoenzimas presentes na preparação sinaptossomal, os dados experimentais obtidos nos ensaios relativos à dependência de ubaína foram usados para ajustar a curva descrita pela Equação 4 (ver “Materiais e métodos”) que consiste na soma de três componentes, correspondentes a três processos inibitórios independentes, não interconvertíveis e saturáveis, com diferentes afinidades (muito alta, alta e baixa) (Figura III.29.B). Uma vez que os dados gerados pela função ajustada foram comparáveis aos valores obtidos experimentalmente, os parâmetros de ajuste foram considerados como correspondendo às concentrações de ubaína que produziram 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) da reacção hidrolítica atribuível a cada uma das isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal.

Verificou-se que a actividade enzimática podia ser decomposta em três componentes de muita alta sensibilidade ( $IC_{50} = 5,4 \times 10^{-10}$  M), alta sensibilidade ( $IC_{50} = 3,7 \times 10^{-7}$  M) e baixa sensibilidade ( $IC_{50} = 5,2 \times 10^{-5}$  M) a ubaína, respectivamente, cujas contribuições para



**Figura III. 28.** Efeito da exposição crónica a alumínio na expressão *in vivo* da  $(Na^+/K^+)ATPase$  sinaptossomal.

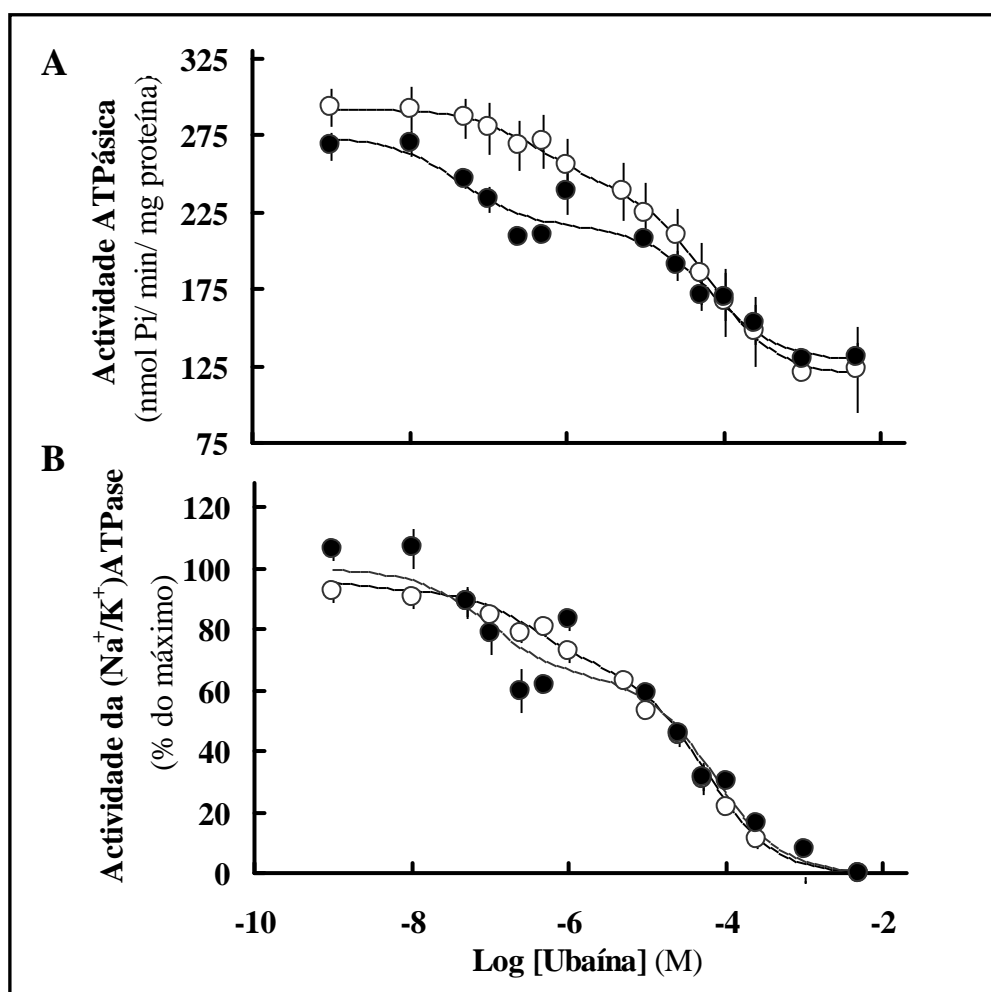
No final do período experimental (120 dias), as fracções sinaptossomais foram preparadas a partir do córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo (□) e de ratos que receberam diariamente 0,03 g de  $AlCl_3$  durante quatro meses (■). **Painel A:** as proteínas sinaptossomais (100 µg/ linha) foram separadas por SDS-PAGE e subsequentemente imunodetectadas com os anticorpos anti-NASE (subunidade  $\alpha_1$ ), anti-HERED (subunidade  $\alpha_2$ ), anti-TED (subunidade  $\alpha_3$ ) e actina (actina  $\alpha$ ), como descrito nos “Materiais e métodos”. Os dados representam uma experiência típica de 7 experiências independentes. **Painel B:** análise por densitometria das membranas. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 7 determinações independentes.

a actividade total da  $(Na^+/K^+)ATPase$ , na presença de  $Na^+$  (128 mM),  $K^+$  (5 mM),  $Mg^{2+}$  (10 mM) e ATP em concentrações saturantes, foram estimadas em ~6%, ~26% e ~68%, respectivamente. Os valores de  $IC_{50}$  determinados situam-se na gama dos valores reportados na literatura para as isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $(Na^+/K^+)ATPase$  no cérebro

de rato, nomeadamente,  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  M (subunidade  $\alpha_3$ ),  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M (subunidade  $\alpha_2$ ) e  $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  M (subunidade  $\alpha_1$ ) (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1990; Gerbi & Maixent, 1999; Lopez *et al.*, 2002).

Com o objectivo de verificar se a administração na dieta de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante um período de 120 dias (0,03 g/dia) causou alteração nos níveis de expressão das isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , foi realizada a análise por imunodeteção das bandas imunopositivas, anti-NASE, anti-HERED e anti-TED, usando as mesmas quantidades totais de proteína sinaptossomal obtidas a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo e ao grupo de exposição a alumínio (Figura III.28.A e B). Todas as isoformas da subunidade  $\alpha$  não demonstraram nenhuma alteração significativa nos níveis de expressão em sinaptossomas ( $p > 0,7$  para todos os valores). Do mesmo modo, a curva “dose-resposta” da inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pela ubaína permaneceu quase inalterada, exibindo valores de  $IC_{50}$  de  $4,5 \times 10^{-8}$ ,  $1,1 \times 10^{-7}$  e  $6,5 \times 10^{-5}$  M (Figura III. 29).

Estes resultados parecem indicar que a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  causou inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal, sem comprometer nem a expressão das isoformas da subunidade  $\alpha$ , nem a sensibilidade (alta e baixa) a ubaína das isoenzimas. É interessante notar que, a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  parece tornar a enzima menos sensível às concentrações mais baixas de ubaína. Para estimar o efeito inibitório do alumínio nas distintas isoformas, foram comparadas as actividades de ATPase na ausência e na presença de  $10^{-6}$  e  $5 \times 10^{-3}$  M de ubaína, uma vez que ubaína  $10^{-6}$  M inibe sobretudo as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  enquanto que a isoforma  $\alpha_1$  permanece quase inalterada. Foi observado que ambas as componentes (isoformas  $\alpha_2/\alpha_3$  e isoforma  $\alpha_1$ ) contribuíram activamente para a diminuição global (~30%) da actividade total de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida por alumínio, dado que as componentes  $\alpha_2/\alpha_3$  e  $\alpha_1$  foram reduzidas em, respectivamente, ~59% e ~19%, relativamente às actividades exibidas quando analisadas em sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo.



**Figura III. 29.** Efeito da exposição crónica oral a alumínio na actividade das isoenzimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal.

No final do período experimental (120 dias), as fracções sinaptossomais foram preparadas a partir do córtex cerebral de ratos pertencentes ao grupo controlo ( $\circ-\circ$ ) e de ratos que receberam diariamente 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante quatro meses ( $\bullet-\bullet$ ). **Painel A:** Curvas “dose-resposta” de inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pela ubaína. As condições experimentais são semelhantes às descritas na legenda da Figura III.21. Os valores são expressos em nmol Pi/min/mg proteína e representam a média  $\pm$  o erro padrão de 9-18 determinações independentes. **Painel B:** Curvas “dose-resposta” de inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  expressa em percentagem das respectivas actividades máximas. As curvas representam as funções ajustadas, tal como descrito em “Materiais e métodos” [Equação 4], que consiste na soma de três processos inibitórios independentes, não interconvertíveis e saturáveis de muito alta, alta e baixa afinidade.

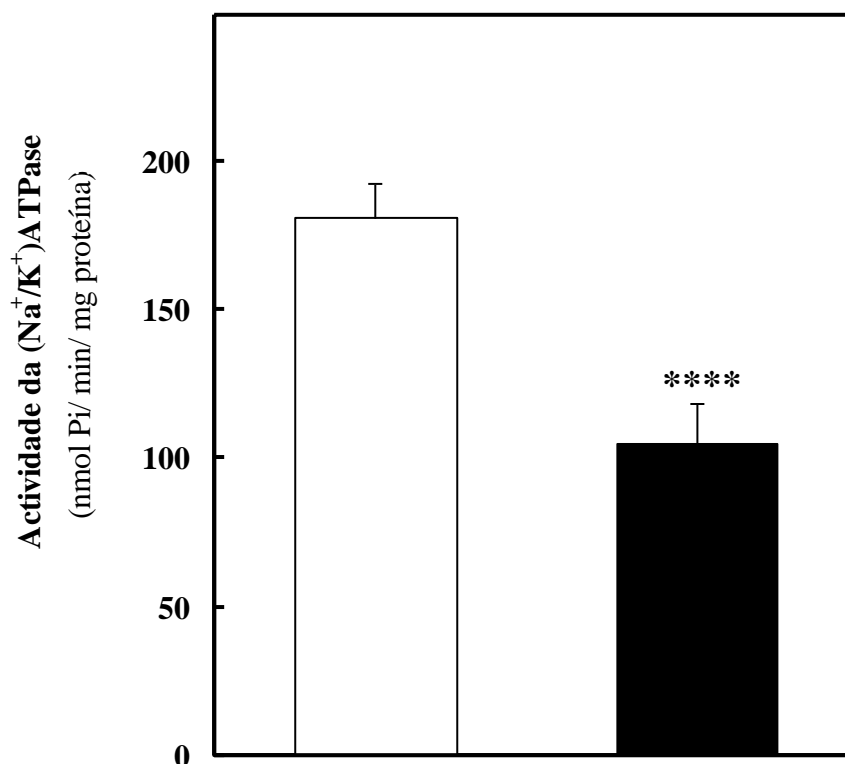
É geralmente aceite que no rim do rato apenas estão presentes as isoformas  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Mobasheri *et al.*, 2000), formando o protómero  $\alpha_1/\beta_1$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , que é altamente resistente à inibição por ubaína ( $IC_{50} = 10^{-5}$  a  $10^{-3}$  M) (Gerbi & Maixent, 1999; Lopez *et al.*, 2002; Dmitrieva & Doris, 2003). Porém, já foi relatado um ténue efeito inibitório na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal por concentrações submicromolares de ubaína (Dmitrieva & Doris, 2003).

Para confirmar o efeito da exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , foi avaliada a actividade da enzima (Figura III.30) e a expressão proteica (Figura III.31) no rim, onde o incremento de alumínio durante a exposição de quatro meses foi de  $\sim 3,5$  ng  $\text{Al}^{3+}/\text{mg}$  proteína de rim (Figura III.8).

Na nossas condições experimentais, nos homogeneizados de rim apenas foi detectada a subunidade  $\alpha_1$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III.31). Os resultados da análise densitométrica da proteína imunodetectada (Figura III.31.B), indicaram que a quantidade da subunidade  $\alpha_1$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  nos ratos do grupo de exposição a  $\text{AlCl}_3$  foi ligeiramente inferior à quantificada no grupo controlo, mas não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos ( $p > 0,3$ ).

Pelo contrário, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi reduzida significativamente ( $\sim 42\%$ ) após a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  (Figura III.30). As curvas “dose-resposta” da inibição por ubaína da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foram coincidentes para elevadas concentrações ( $> 5 \times 10^{-5}$  M) de ubaína (Figura III.32.A) e o valor de  $IC_{50}$  permaneceu quase inalterado durante a exposição a  $\text{AlCl}_3$ , exibindo valores de  $9,5 \times 10^{-5}$  M (condição controlo) e  $3,7 \times 10^{-4}$  M (exposição *in vivo*) (Figura III.32.B). Por outro lado, a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  aboliu completamente a inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por concentrações de ubaína inferiores a  $10^{-6}$  M.

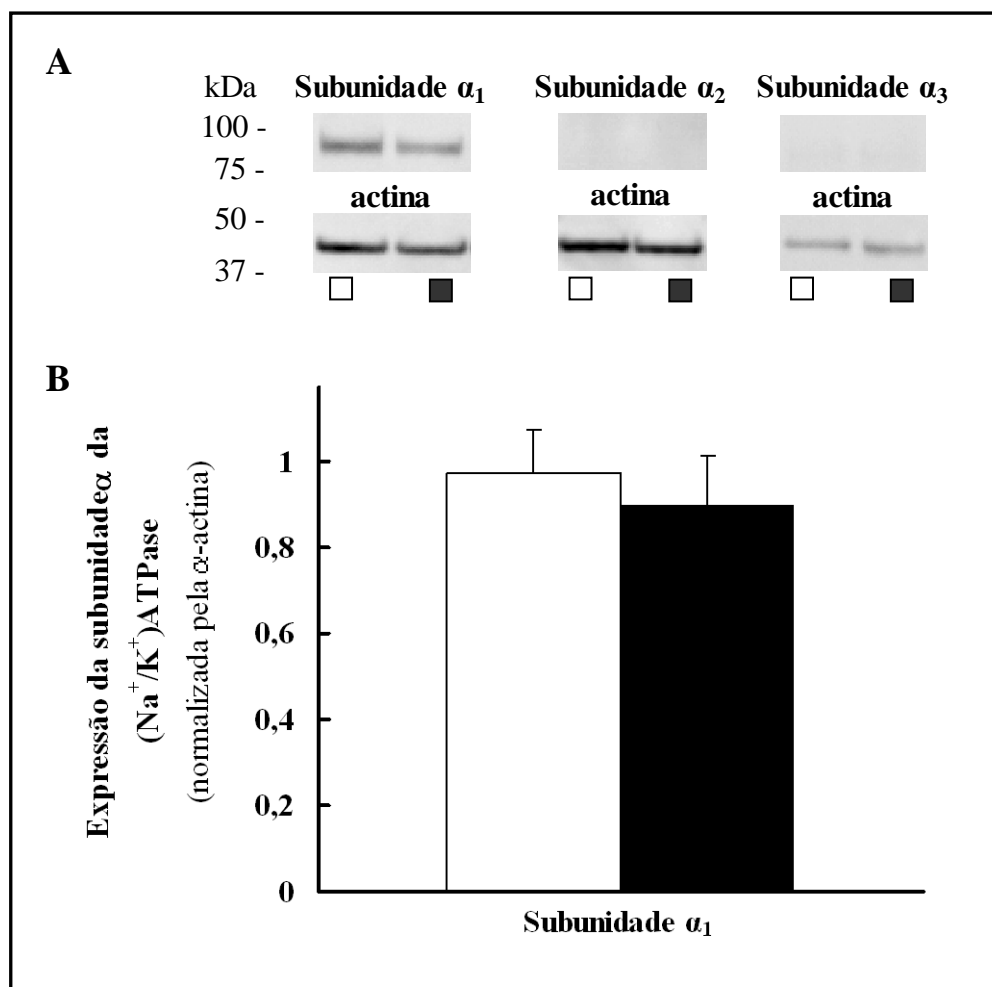
Estes resultados sugerem que a acumulação de alumínio nos tecidos durante a administração crónica de  $\text{AlCl}_3$  na dieta diminuiu a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sem comprometer a expressão das isoformas da subunidade  $\alpha$ .



**Figura III. 30.** Efeito da exposição crónica a alumínio na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase renal.

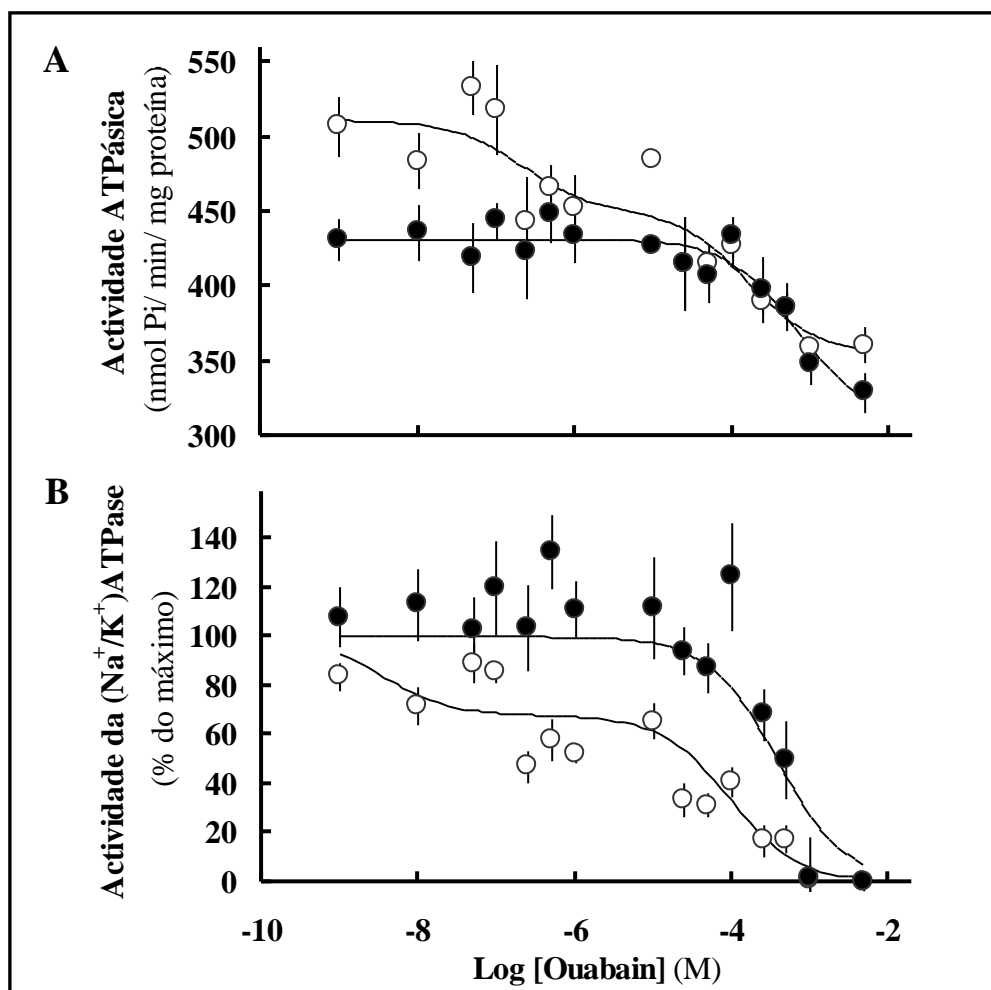
Os homogeneizados totais de rim (0,1 mg proteína/ml) foram incubados durante 5 min a 35°C num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 100 µM e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4), na ausência e na presença de 5 mM de ubaína. As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final de 3 mM). Após 5 min, a reacção foi finalizada e a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase determinada como descrito em “Materiais e métodos”. □, condição controlo (homogeneizados preparados a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo); e ■, exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub> (homogeneizados preparados a partir de ratos que receberam diariamente 0,03 g de AlCl<sub>3</sub> durante 4 meses). Os valores são apresentados como a média ± o erro padrão de 6 determinações independentes. \*\*\*\* p < 0,001.





**Figura III. 31.** Efeito da exposição crónica a alumínio na expressão *in vivo* da  $(Na^+/K^+)ATPase$  renal.

No final do período experimental (120 dias), os homogeneizados totais foram preparados a partir dos rins de ratos pertencentes ao grupo controlo ( □ ) e de ratos que receberam diariamente 0,03 g de  $AlCl_3$  durante quatro meses ( ■ ). **Painel A:** as proteínas do rim (100  $\mu$ g/ linha) foram separadas por SDS-PAGE e subsequentemente imunodetectadas com os anticorpos anti-NASE (subunidade  $\alpha_1$ ), anti-HERED (subunidade  $\alpha_2$ ), anti-TED (subunidade  $\alpha_3$ ) e actina (actina  $\alpha$ ), como descrito em “Materiais e métodos”. Os dados representam uma experiência típica de 7 experiências independentes. **Painel B:** análise por densitometria das membranas. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 7 determinações independentes.



**Figura III. 32. Efeito da exposição crônica a alumínio na actividade da isoenzima da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal.**

Os homogeneizados totais foram preparadas a partir dos rins de ratos pertencentes ao grupo controlo ( $\circ-\circ$ ) e de ratos que receberam diariamente 0,03g de  $\text{AlCl}_3$  durante quatro meses ( $\bullet-\bullet$ ). **Painel A:** Curvas “dose-resposta” de inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pela ubaína. As condições experimentais são semelhantes às descritas na legenda da Figura III.29. Os valores são expressos em nmol Pi/ min/ mg proteína e representam a média  $\pm$  o erro padrão de 8-16 determinações independentes. **Painel B:** Curvas “dose-resposta” de inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  expressa em percentagem das respectivas actividades máximas. As curvas representam as funções ajustadas, tal como descrito em “Materiais e métodos” [Equação 4], que consiste na soma de um ou dois processos inibitórios independentes, não interconvertíveis e saturáveis de muito alta e baixa afinidade.



## IV - Discussão

---

**A análise do potencial tóxico do alumínio é relativamente recente, estando o seu início associado aos finais do século XIX (Doelken, 1897), enquanto que, por exemplo, os perigos inerentes à exposição ao chumbo são reconhecidos há já, pelo menos, 2375 anos. A classificação de uma substância como tóxica implica a demonstração de que a sua presença no organismo vivo, em determinadas concentrações e em virtude da sua estrutura química, provoca, através de mecanismos físico-químicos/bioquímicos, alterações transitórias ou permanentes no funcionamento celular inconciliáveis com o estado saudável do organismo, podendo ou não causar a morte.**

É evidente que a análise da toxicidade dum composto é uma tarefa multidisciplinar, que se desdobra em numerosas fases. Neste contexto, a verificação de que uma substância química induz um padrão consistente de disfunções neuronais ou lesões no sistema nervoso é considerada crucial para definir a sua toxicidade (Tilson, 1990; Johnsen *et al.*, 1992; ECETOC, 1992; Johnsen *et al.*, 1992; O'Donoghue, 1994; Ladefoged *et al.*, 1995). A neurotoxicidade pode traduzir não só a interacção directa do composto ou dos seus metabolitos com os constituintes do sistema nervoso, bem como reflectir a interacção com locais exteriores ao sistema nervoso. Apesar da vulnerabilidade/fragilidade do sistema nervoso face às agressões químicas ser elevada, a sua análise é complexa, dado poder manifestar-se por alterações ténues do comportamento, cuja avaliação a nível populacional é extremamente difícil. Além do mais, as manifestações de neurotoxicidade podem ser diferentes consoante a idade, a dose, a duração e via de exposição (WHO, 2001). O sistema nervoso é altamente complexo e a sua actividade exhibe elevado nível de integração. Por isso, o estabelecimento da relação “dose-resposta” é particularmente difícil para as substâncias que exercem efeitos neurotóxicos directos ou indirectos (Ladefoged *et al.*, 1995; WHO, 2001). Por conseguinte, o conhecimento dos mecanismos de neurotoxicidade é imprescindível não só para diferenciar os efeitos directos dos indirectos, mas também para a avaliação de risco.

Neste trabalho demonstrou-se claramente que a administração diária, por via oral, de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ , durante 120 dias, a ratos Wistar, machos com um mês de idade e ~250 g

de peso à data do início da exposição, provocou um aumento de  $\sim 7$  ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína na concentração total de  $\text{Al}^{3+}$  nos terminais pré-sinápticos isolados do córtex cerebral (Figura III.7 e 16) e a inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III.13 e 24). Este efeito inibitório foi produzido sem registo de alterações significativas na expressão das isoformas da subunidade catalítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III.28), no aumento do peso corporal (Figura III.6), na ultra-estrutura dos terminais pré-sinápticos isolados (Figura III.9), na integridade da membrana pré-sináptica (Tabelas III.3 e 4) e no potencial de carga energética adenínica (Tabela III.4) dos terminais pré-sinápticos isolados. O efeito inibitório do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi verificado também nos ensaios *in vitro*, revelando-se dependente da concentração de  $\text{AlCl}_3$  no meio de reacção (Figura III.22) e conservando também a característica fundamental, nomeadamente a ausência de activação adicional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por concentrações elevadas de ATP (Figura III.24). No modelo experimental usado foram observadas alterações ao nível da fluidez de membrana (Figura III.10 e 17) e no balanço prooxidante-antioxidante (Figuras III.11 e 12). No entanto, não se verificaram alterações semelhantes nos ensaios realizados *in vitro* (Figuras III.19 e 27). O efeito do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  ao nível da actividade hidrolítica de ATP parece ser extensível à actividade de transporte de  $\text{Na}^+$ , visto que a acumulação activa de GABA, que requer a existência do gradiente transmembranar de  $\text{Na}^+$ , foi significativamente reduzida pelo  $\text{AlCl}_3$  (Figura III.26) quando presente em concentrações que provocam inibição acentuada da actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figuras III.22 e 24).

### ***1. Relevância do modelo experimental e dos parâmetros avaliados para a compreensão do papel da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na neurotoxicidade do alumínio***

A diversidade dos seres vivos encerra a universalidade dos processos e das entidades moleculares, das quais emerge a relação entre a estrutura e a função na actividade biológica. O conhecimento da diversidade e da universalidade da matéria viva tem permitido o desenvolvimento de modelos adequados para estudos de toxicidade (Russell, 1991). A avaliação dos efeitos adversos no sistema nervoso deve ser efectuada com recurso

aos mais diversos modelos, de modo a possibilitar a obtenção de grande variedade de informação útil, que ajude a minimizar o risco de neurotoxicidade.

Os estudos clínicos e epidemiológicos em populações humanas sobre a toxicidade do alumínio são escassos, sendo ainda mais reduzidos os estudos toxicológicos em seres humanos (Gresham *et al.*, 1986; Alessio *et al.*, 1989; Cases *et al.*, 1990; McCarthy *et al.*, 1990; Day *et al.*, 1991; Kaaber *et al.*, 1992; Bast-Pettersen *et al.*, 2000). Além do mais, é imperativo promover a transferência do rastreio de toxicidade baseado em teste com animais (*in vivo*) para testes com órgãos, tecidos, culturas celulares e fracções subcelulares (*in vitro*) e, finalmente, para testes computacionais de cálculo de mecânica molecular. Actualmente, os estudos *in vitro* são ainda considerados complementares e usados para conceber estudos toxicológicos *in vivo*. A continuação da utilização da experimentação *in vivo* tem sido justificada pela incapacidade das baterias de testes *in vitro* avaliarem a influência das interações dos vários sistemas de órgãos no desenvolvimento e expressão dos efeitos tóxicos (WHO, 2001). Consensual é, sem dúvida, a importância actual dos ensaios *in vitro* para a obtenção de informação respeitante ao mecanismo de acção de toxinas e xenobióticos (Atterwill & Walum, 1989; Goldberg & Frazier, 1989; Harry *et al.*, 1998). Neste trabalho foram comparados os efeitos do alumínio em ensaios *in vivo* e *in vitro*, bem como quantificadas as concentrações de alumínio que produziram os efeitos em ambas as estratégias.

Após a administração oral de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  quantificou-se a concentração de alumínio no sangue (Figura III.1), urina (Figura III.3) e fezes (Figura III.5), com o objectivo de avaliar a sua disponibilidade na circulação sistémica (Gupta *et al.*, 1986; Day *et al.*, 1991; 1994; Priest, 1994). Considerando a via de exposição usada, a disponibilidade sistémica do alumínio é muito relevante para a avaliação da sua neurotoxicidade (Yokel & McNamara, 2001).

A espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite é considerada adequada para a quantificação de  $\text{Al}^{3+}$  em amostras biológicas, permitindo determinar a concentração total deste metal na amostra (Coedo *et al.*, 1996). A natureza ubíqua do alumínio e as concentrações normalmente existentes nos tecidos dos animais, que não foram submetidos a protocolos de exposição a alumínio (WHO, 1997), dificultam a dosagem, isto é, a determinação da quantidade de alumínio absorvida pelo organismo durante 24 horas e expressa por unidade de peso corporal.

A concentração de alumínio no sangue aumentou após a ingestão de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  e a concentração mais elevada ( $1,41 \pm 0,83 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de sangue) foi registada decorridas 3 horas (Figura III.1). Este dado demonstra apenas que a disponibilidade sistémica do alumínio aumentou em consequência da administração de  $\text{AlCl}_3$ . A análise comparativa da quantidade total de alumínio na urina e nas fezes dos ratos que receberam 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  e dos ratos pertencentes ao grupo controlo (Figuras III.3 e 5) confirma o aumento da disponibilidade sistémica do alumínio e evidencia a eficiência das vias de eliminação no rato. Assim, verificou-se um incremento de 52% e de 65% na quantidade total do alumínio presente, respectivamente, na urina (Figura III.3) e nas fezes (Figura III.5) recolhidas durante 5 dias após a ingestão de  $\text{AlCl}_3$ . Estes aumentos reflectem o incremento total registado, pois os níveis basais de  $\text{Al}^{3+}$  foram atingidos na urina ( $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$  de urina) e nas fezes ( $98,8 \pm 9,2 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{g}$  de fezes) ao fim de, respectivamente, 2 e 3 dias.

Apesar da dificuldade em comparar os resultados obtidos com os descritos por outros autores, dada a diversidade de protocolos de exposição, as quantidades e variedade de compostos de alumínio utilizados, as espécies e faixas etárias usadas, os resultados obtidos parecem estar de acordo com estudos realizados anteriormente. Cerca de 90% do total de alumínio excretado na urina é colectado durante as primeiras 48 horas após administração, quando a quantidade administrada por via oral ao rato é reduzida ( $3,8 \text{ ng } ^{26}\text{Al} + 63 \text{ ng } ^{27}\text{Al}$ ) (Jouhanneau *et al.*, 1997). No mesmo estudo, foi possível verificar a acumulação de  $^{26}\text{Al}$  no osso após 1 hora e a sua permanência pelo menos durante 30 dias, o que parece indicar que o alumínio administrado por via oral se distribui rapidamente pelos diversos tecidos e que a sua remoção é lenta. Estudos realizados em seres humanos, revelaram que após injeção intravenosa de  $^{26}\text{Al}$ , ~27% do metal administrado ficou retido no organismo (ver Berthon, 2002 para revisão).

A avaliação da absorção e eliminação do alumínio, na sua globalidade (págs. 48-55), permitiu confirmar que o alumínio existe habitualmente no sangue, na urina e nas fezes dos ratos Wistar, machos e adultos jovens, o que evidencia a disponibilidade sistémica deste metal mesmo em condições de exposição, não intencional, a alumínio. Por conseguinte, os protocolos de exposição durante períodos longos parecem apropriados à simulação da exposição natural dos seres vivos a alumínio por via oral.

O teor em espécies químicas de alumínio biodisponíveis na água potável varia em função das características geológicas dos locais de captura e dos processos de tratamento e



distribuição (LaZerte *et al.* 1997; Health Canada, 1998). Contudo, a água como veículo de exposição oral a alumínio parece, duma maneira geral, não fornecer, em média, mais do que ~1% da quantidade diária de alumínio ingerida pelos seres humanos (Water Research Center, 1990). Pelo contrário, os demais alimentos surgem como a principal fonte de alumínio para os seres humanos saudáveis, variando, consideravelmente, a quantidade ingerida em função da composição da dieta (Pennington, 1987; Greger & Sutherland, 1997).

Tal como referido anteriormente (pág. 48), o teor em alumínio da água fornecida aos ratos utilizados neste trabalho foi inferior a 12 µg/l, enquanto que a ração continha aproximadamente 158 mg de  $\text{Al}^{3+}$ /kg de ração. A opção pelo regime de alimentação *ad libitum* não permitiu calcular a quantidade total de alumínio ingerida ao longo do período experimental. Porém, os resultados obtidos demonstram que a administração diária de 0,03 g  $\text{AlCl}_3$  provocou a alteração da disponibilidade sistémica do alumínio e que a administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia) provocou um aumento de ~7 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína no conteúdo em alumínio dos terminais pré-sinápticos isolados (Figura III.7). É importante referir que os terminais nervosos parecem constituir locais privilegiados de acumulação do alumínio, pois, mesmo nas situações controlo os níveis quantificados foram da ordem dos 10-11 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína, enquanto que nos homogeneizados totais de cérebro não ultrapassaram os 2-3 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína (Figura III.8). Por outro lado, após administração, a concentração de alumínio nos homogeneizados totais de cérebro foi de  $2,8 \pm 0,5$  ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína.

Os mecanismos subjacentes à acumulação de alumínio no tecido nervoso não estão completamente esclarecidos. Vários processos de translocação através das biomembranas (transporte activo, endocitose e difusão facilitada) têm sido analisados, de forma a conhecer a sua contribuição relativa na homeostasia global do alumínio na célula. O transporte do alumínio parece aumentar significativamente na presença de “transportadores” membranares apropriados, assim como na presença de fortes ligandos intracelulares (Fatemi *et al.*, 1991; Panchalingam *et al.*, 1991; Ackley & Yokel, 1997; Deng *et al.*, 2000; Lévesque *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Yokel *et al.*, 2002). Os resultados apresentados confirmam os anteriormente obtidos por outros investigadores, que demonstraram que o alumínio administrado por via oral pode atravessar a barreira hematoencefálica e provocar o aumento da quantidade de alumínio no cérebro (Lal *et al.*,

1993; Golub *et al.*, 1995; Walton *et al.*, 1995; Domingo *et al.* 1996; Jouhanneau *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2000). Por outro lado, as diferenças encontradas entre os aumentos da quantidade de alumínio nos sinaptossomas de córtex cerebral (Figura III.7) e nos homogeneizados totais de cérebro (Figura III.8) podem contribuir para explicar os resultados, aparentemente discordantes, obtidos por outros investigadores. Glynn *et al.* (1995) não observaram qualquer variação dos níveis de alumínio no cérebro total do rato após ingestão de água contendo  $\text{AlCl}_3$  (4 mg/l) durante 10 semanas (Glynn *et al.*, 1995) e Domingo *et al.* (1996) não encontraram qualquer variação dos níveis do alumínio no córtex cerebral após administração diária de 50 e 100 mg de  $\text{AlCl}_3$  por kg de peso corporal, durante 6,5 meses (Domingo *et al.*, 1996). Nas nossas condições experimentais só foi possível observar um aumento estatisticamente significativo da quantidade de alumínio acumulado no cérebro, quando a análise foi efectuada nos sinaptossomas, o que parece reflectir a distribuição heterogénea deste metal pelos diferentes compartimentos celulares, tipos de células e regiões cerebrais. De facto, vários estudos ilustram a distribuição desigual do alumínio em diferentes regiões cerebrais (Andrási *et al.*, 1995; Deloncle *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1996; Nostrandt *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2001), tipos de células (Lévesque *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2002) e compartimentos celulares (Szotowicz *et al.*, 1998; Miu *et al.*, 2004). Além do mais, a ocorrência de acumulação de alumínio no cérebro varia em função da duração da exposição (Glynn *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1996), da dose (Greger, 1993; Glynn *et al.*, 1995), do composto administrado (Allain *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998) e da via de administração (Greger, 1993).

A toxicidade do alumínio não se manifesta apenas ao nível do sistema nervoso, e as diferenças individuais no metabolismo e na permeabilidade ao alumínio contribuem para o desenvolvimento de efeitos tóxicos (Walton *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 2004). A partição do alumínio pelos diferentes órgãos e tecidos animais é distinta, tanto em indivíduos sujeitos a intoxicação comprovada como em indivíduos “não intoxicados” (Alfrey *et al.*, 1980; Di Paolo *et al.*, 1997; Greger & Sutherland, 1997). Por exemplo, as concentrações elevadas de alumínio encontradas nos pulmões reflectem, essencialmente, a exposição por inalação das partículas de alumínio existentes no ar (Venugopal & Luckey, 1978; Ganrot, 1986), enquanto que a elevação das concentrações nos ossos, fígado e baço evidenciam, fundamentalmente, a absorção do alumínio por via gastrointestinal (Yokel & McNamara, 2001).

No presente estudo, para além do cérebro, apenas se analisou a quantidade de alumínio no coração, no fígado e nos rins (Figura III.8). Nos ratos controlo, os valores da concentração de alumínio foram, respectivamente, ~4,5; ~1,8 e ~3,7 ng Al<sup>3+</sup>/mg de proteína, enquanto estes valores, após a administração oral de 0,03 g de AlCl<sub>3</sub>/dia durante 4 meses, foram, respectivamente, ~3,6; ~1,0 e ~7,1 ng Al<sup>3+</sup>/mg de proteína. Por conseguinte, foi bem notório o aumento da concentração de alumínio no rim, que poderá também traduzir o facto dos animais terem sido sacrificados no dia subsequente ao término do período de exposição.

Considerando o volume médio dos sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral igual a 3,2 µl/mg de proteína (Scott & Nicholls, 1980), após o período de exposição o valor da concentração total de alumínio nos sinaptossomas isolados a partir do córtex deveria ser de ~202 µM. Concentrações mais elevadas, da ordem dos 500 µM, foram encontradas, por exemplo, nas placas senis características das encefalopatias (Crapper *et al.*, 1973). Em termos clínicos, a associação entre a intoxicação crónica por via sistémica e o aparecimento de encefalopatias em pacientes urémicos em hemodiálise está bem documentada (Wills & Savory, 1988; Meiri *et al.*, 1993; Burwen *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 2002). A quantificação *post-mortem* das concentrações de alumínio no cérebro de pacientes com encefalopatia de diálise revelou serem estas 10 a 12 vezes superiores ao normal (Wolff *et al.*, 2002), enquanto que o aumento produzido pelo protocolo de exposição usado foi apenas de 1,6 vezes nos terminais pré-sinápticos isolados. Deste modo, parece que as condições de exposição escolhidas podem, de algum modo, simular uma situação de intoxicação crónica, por via oral, sem efeitos neurológicos subclínicos notáveis.

A administração de 3,60 g de AlCl<sub>3</sub> ao longo de 4 meses (0,03 g AlCl<sub>3</sub>/dia), não alterou o peso corporal dos ratos. Considerando que o peso inicial dos ratos era de 249,0 ± 5,8 g, a dose administrada corresponde a ~120 mg/kg de peso corporal. Ao longo do período experimental (4 meses) observou-se um incremento do peso corporal de todos os ratos (~130-140 g), sendo este incremento semelhante nos ratos expostos a alumínio e nos ratos controlo (Figura III.6). Diminuições significativas do peso corporal em resultado da exposição prolongada do rato a alumínio foram observadas por diversos investigadores (Lal *et al.*, 1993; Rajasekaran, 2000; Colomina *et al.*, 2002). No entanto, estas alterações parecem ser acentuadas pela inibição da ingestão de alimento. De facto, Lal *et al.* (1993)

observou uma diminuição (13%) após 180 dias de administração de  $\text{AlCl}_3$ , 12 mg /dia/kg de peso corporal, enquanto que a administração de 16 mg /dia/kg de peso corporal provocou uma diminuição mais acentuada (19%) do peso corporal, acompanhada de uma redução do consumo de alimentos (~36%), em apenas 30 dias (Rajasekaran, 2000).

Vários estudos utilizaram baterias de testes comportamentais para avaliar competências gerais e específicas do sistema nervoso, após exposição oral a alumínio (Clauberg & Joshi, 1992; Lal *et al.*, 1993; Domingo *et al.*, 1996; Strydom *et al.*, 1997). Os resultados demonstraram que os níveis de actividade exploratória e locomotora dos ratos não eram afectados pela exposição oral a nitrato ou cloreto de alumínio em doses inferiores a 100 mg/kg de peso corporal e por períodos não superiores a 6,5 meses. De forma similar, nas nossas condições experimentais, a exposição a alumínio não induziu alterações significativas nos níveis de desempenho no teste em campo aberto (Tabela III.1). No teste de evitamento passivo registou-se uma tendência de aumento do valor médio de latência subsequente de resposta (Tabela III.2). No entanto, tal como referido anteriormente (pág. 60) não foi avaliada a sensibilidade à dor dos ratos pertencentes aos grupos controlo e de exposição. Por conseguinte, o alongamento da extinção do comportamento de evitamento passivo registado pode não espelhar um melhoramento das competências de aprendizagem/memória, mas reflecte, inequivocamente, uma alteração comportamental indicativa de neurotoxicidade induzida pelo protocolo de exposição crónica a alumínio usado neste trabalho. Outros investigadores têm observado profundas alterações de comportamento induzidas pela administração de  $\text{AlCl}_3$  por via oral, em doses superiores às usadas neste trabalho. Jing e colaboradores (2004) administraram 500 mg/kg de peso corporal durante 3 meses e testaram a capacidade dos ratos na aprendizagem e memória pelo teste de “Morris Water Maze”. Estes investigadores observaram que os ratos expostos a alumínio levaram mais tempo a encontrar a plataforma submersa, o que indica uma degradação da capacidade de aprendizagem e memória. Rajasekaran (2000) administrou 260 mg/kg de peso corporal durante um período de tempo mais curto (30 dias) e observou uma diminuição significativa na actividade motora espontânea, um índice de comportamento motivado, porque é um comportamento exploratório num novo ambiente. Por outro lado, compostos de alumínio quando administrados por via intraperitoneal provocam alterações comportamentais em doses bastante mais reduzidas. A administração de lactato de alumínio (10 mg/kg/dia) durante 4 semanas diminui a capacidade de

aprendizagem no teste de evitamento passivo (Julka *et al.*, 1995), enquanto que foi observada uma diminuição na tarefa de condicionamento ao medo e maior dificuldade na aprendizagem das respostas condicionadas após a administração de gluconato de alumínio (0,85 mg/kg de peso corporal) durante 6 meses (Miu *et al.*, 2003).

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é uma enzima transmembranar, cuja actividade é muitas vezes avaliada em estudos neurotoxicológicos, como indicador da actividade da membrana plasmática das células nervosas (Hussain *et al.*, 1987; Pal *et al.*, 1993; Fritz *et al.*, 1999; Kakko *et al.*, 2003; Yallapragada *et al.*, 2003; Carageorgiou *et al.*, 2004). A vantagem da quantificação da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em ensaios de neurotoxicidade é plenamente justificada pela importância desta enzima na sustentação da excitabilidade neuronal, uma das principais propriedades do sistema nervoso, e pela elevada sensibilidade desta actividade enzimática às alterações estruturais e energéticas. A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  converte a energia obtida a partir da hidrólise de ATP em energia electroquímica, ao formar os gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática. Estes, por sua vez, são as principais fontes energéticas dos sistemas de transporte activo secundário e desempenham um papel fundamental na condução e transmissão do impulso nervoso e na homeodinâmica celular. A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  causa profundas alterações no funcionamento do sistema nervoso, podendo conduzir à morte neuronal (Lees & Leong, 1994).

A administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia), não alterou a ultra-estrutura característica da fracção sinaptossomal (Figura III.9), a integridade da membrana plasmática (Tabela III.3), nem o potencial de carga energética adenínica (Tabela III.4) dos terminais pré-sinápticos isolados a partir do córtex cerebral do rato. Assim, no modelo experimental usado, o efeito inibitório do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III.13) antecede as alterações profundas da integridade da membrana pré-sináptica e da produção de ATP, consideradas como indicadores primários da viabilidade celular (Hardie & Hawley, 2001; Nicholls & Budd, 2000). A relevância da observação do efeito inibitório do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  seria ínfima, no caso deste efeito ser apenas observável em concomitância com a modificação dos parâmetros referidos. Por outras palavras, os resultados obtidos sugerem o envolvimento da inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no mecanismo de acção neurotóxica do alumínio.

Como já foi referido anteriormente, a administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia) inibiu significativamente (~30%) a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , mas não modificou a acumulação de GABA pelos sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral (Figura III. 14). O transporte activo de GABA pelos terminais nervosos dependente do gradiente electroquímico de sódio mantido pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figura III. 26; Santos *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1990), pelo que pode ser considerado como um indicador das alterações da magnitude do gradiente transmembranar de  $\text{Na}^+$ . No modelo experimental utilizado, a capacidade de acumulação de GABA manteve-se inalterada, sugerindo que o grau de inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  nos terminais sinápticos intactos parece ser compatível com a manutenção dum gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  de magnitude suficiente para suportar a actividade dos sistemas de transporte activo secundário, dependentes de  $\text{Na}^+$ , presentes na membrana pré-sináptica.

As propriedades prooxidantes do alumínio, nomeadamente a capacidade de potenciar a actividade oxidante dos metais de transição em sistemas biológicos (Gutteridge *et al.*, 1985; Halliwell, 1991; Oteiza *et al.*, 1993; Bondy & Kirshtein, 1996; Xie & Yokel, 1996; Amador *et al.*, 1999; Yoshino *et al.*, 1999), têm justificado a realização de muitos estudos, com o objectivo de esclarecer o papel das alterações do balanço prooxidante-antioxidante nos mecanismos da acção tóxica do alumínio (Bondy *et al.*, 1998b; Exley, 2004; Oteiza *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2005). Neste trabalho, foram quantificados os grupos sulfidrílo e carbonilo presentes na fracção sinaptossomal com recurso, respectivamente, ao reagente de Ellman (Figura III.12) e à reacção com DNPH em meio ácido (Figura III.11). Estes parâmetros, que monitorizam, primordialmente, o stress oxidativo ao nível das proteínas (Kurella *et al.*, 1995; Shacter, 2000), apresentaram-se muito modificados em consequência da administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia). Observou-se uma diminuição significativa (~60%) dos grupos carbonilo e um aumento da velocidade inicial da produção de tionitrobenzoato, que poderá ser justificada pela maior exposição dos grupos SH ao DTNB. De forma similar, Yousef (2004) observou que o conteúdo em grupos SH do cérebro do coelho não foi alterado após exposição crónica a  $\text{AlCl}_3$ . Nas condições experimentais utilizadas, o efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é acompanhado de modificações no balanço prooxidante-antioxidante global nos terminais pré-sinápticos do córtex cerebral, o que, por si só, poderia provocar a inibição da

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. Esta enzima é inibida por promotores do stress oxidativo, tais como os radicais fenoxil, os radicais de óxido nítrico, o peróxido de hidrogénio, o hipoclorito de sódio e o 4-hidroxi-2-nonenal (Kurella *et al.*, 1995; Boldyrev *et al.*, 1997; Kurella *et al.*, 1999; Kadoya *et al.*, 2003).

Estudos anteriores indicam que o efeito estimulatório do alumínio na peroxidação lipídica induzida por Fe<sup>2+</sup>, em condições acídicas, é dependente da composição lipídica das membranas (Ohyashiki *et al.*, 1996; Xie & Yokel, 1996). A interacção do Al<sup>3+</sup> com a fosfatidilserina parece constituir um factor de facilitação da progressão de peroxidação (Gutteridge *et al.*, 1985). A fluidez de membrana constitui um parâmetro apropriado para monitorizar alterações estruturais e funcionais ao nível das biomembranas e, simultaneamente, a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase é extremamente sensível à própria organização da membrana plasmática (Kimelberg & Papahadjopoulos, 1972; Silvius & McEhhaney, 1982; Rauchová *et al.*, 1999; Kadoya *et al.*, 2003). O efeito da administração de 3,60 g de AlCl<sub>3</sub> ao longo de 4 meses (0,03 g AlCl<sub>3</sub>/dia) na fluidez da membrana sinaptossomal foi avaliado, usando as sondas TMA-DPH e DPH (Figura III. 10). Em resposta à administração de AlCl<sub>3</sub>, ocorreu a fluidificação das regiões hidrofóbicas (~8%) e hidrofílicas (~37%) da membrana sinaptossomal. Pandya e colaboradores (2001) também observaram a fluidificação da membrana plasmática sináptica após a administração prolongada (90 a 100 dias) de AlCl<sub>3</sub> na dieta, numa dose idêntica à usada neste trabalho (100 mg AlCl<sub>3</sub>/kg de peso corporal). A maioria dos estudos dedicados à análise do efeito das alterações da fluidez de membrana na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase indica que o aumento da fluidez de membrana favorece a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase (Kimelberg, 1982; Shinitzky, 1984; Rabini *et al.*, 2003).

## ***2. O colesterol modifica a acumulação do alumínio e a alteração da fluidez da membrana pré-sináptica induzida pela exposição a alumínio***

O modelo experimental apresentado neste trabalho e a realização de ensaios *in vitro* na presença de AlCl<sub>3</sub> permitiram o estudo do efeito da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> na acumulação de alumínio e nas alterações da fluidez de membrana dos terminais nervosos do córtex cerebral induzidas pelo alumínio.

Os resultados obtidos sugerem que a susceptibilidade à intoxicação por ingestão de alumínio pode ser condicionada pelo colesterol. Em primeiro lugar, foi observado que a redução da acumulação de alumínio nos terminais nervosos do córtex cerebral do rato está relacionada com a existência de valores reduzidos da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> (Figuras III.15 e 16). Em segundo lugar, a fluidificação da membrana plasmática sináptica (Figuras III.17 e 20.B) parece estar mais associada à redução da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> (Figura III.20.A), do que às alterações da composição em fosfolípidos da membrana (Figura III.18) ou à interacção directa do alumínio com os resíduos da membrana carregados negativamente (Figura III.19).

Tal como referido anteriormente, as diferenças individuais no metabolismo e na permeabilidade ao alumínio podem contribuir para o desenvolvimento de eventos neurotóxicos (Walton *et al.*, 1995). Apesar dos mecanismos subjacentes à acumulação de alumínio nos neurónios não ser bem conhecida, neste trabalho é claramente demonstrado que a administração oral de alumínio aumenta o conteúdo em alumínio dos terminais nervosos do córtex cerebral, o que está de acordo com observações anteriores (Glynn *et al.*, 1995; Walton *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2000). O transporte do alumínio parece aumentar significativamente na presença de “transportadores” membranares apropriados, assim como na presença de fortes ligandos intracelulares (Fatemi *et al.*, 1991; Panchalingam *et al.*, 1991; Ackley & Yokel, 1997; Deng *et al.*, 2000; Lévesque *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Yokel *et al.*, 2002). Além disso, a adsorção do alumínio ao nível das biomembranas parece ser dependente do conteúdo em fosfolípidos polares, tais como a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina (Deleers *et al.*, 1985; Akeson *et al.*, 1989; Oteiza, 1994; Ohyashiki *et al.*, 1998; Verstraeten *et al.*, 1997; 1998; Verstraeten & Oteiza, 2000). Por outro lado, neste trabalho verificou-se que a razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> sinaptossomal parece influenciar a acumulação do alumínio nos terminais nervosos do córtex cerebral (Figuras III.15 e 16). Este efeito foi acompanhado pela redução significativa da razão molar fosfatidiletanolamina/fosfolípidos totais, enquanto que as razões molares esfingomielina/, fosfatidilcolina/ e fosfatidilserina/fosfolípidos totais não sofrem alteração (Figura III.18), indicando que, de entre os fosfolípidos analisados, a fosfatidiletanolamina sofreu uma diminuição mais acentuada.

Apesar do mecanismo subjacente à redução da razão molar fosfatidiletanolamina/fosfolípidos totais não ter sido esclarecido, os resultados obtidos



sugerem que a alteração do metabolismo e/ou do tráfego da fosfatidiletanolamina durante o período de exposição a alumínio não pode ser atribuída a modificações das etapas iniciais da síntese dos fosfolípidos ou da interconversão de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilserina. O envolvimento das fosfolipases como mediadores da redução do conteúdo em fosfatidiletanolamina induzida por exposição *in vivo* a alumínio parece pouco provável, pois quando presente em elevadas concentrações no meio de reacção, o alumínio inibe a actividade de fosfolipase (Jones & Kochian, 1997; Pina-Chable & Hernandez-Sotomayor, 2001). Porém, não é conhecido o efeito do alumínio na actividade de fosfolipase D dos mamíferos, que é específica para a fosfatidiletanolamina (Kiss *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 1996; Madesh & Balasubramanian, 1997; Kobayashi *et al.*, 2001; Pettitt *et al.*, 2001). No entanto, foi observado que o  $Al^{3+}$  activa a transesterificação da fosfatidiletanolamina pela fosfolipase D de *Streptomyces cinnamomeum* (Ogino *et al.*, 1999). A contribuição do eventual efeito do alumínio na incorporação celular de fosfatidiletanolamina mediada por lipoproteínas (Urban *et al.*, 2000; Gillotte-Taylor *et al.*, 2002) não pode ser excluída, uma vez que também foi detectada uma redução da fosfatidiletanolamina após o tratamento prolongado com Colestipol (Figura III. 18). Outra explicação possível para a diminuição do conteúdo em fosfatidiletanolamina é a diminuição específica deste plasmalogeno. Esta subclasse representa um dos principais alvos durante a lesão do sistema nervoso central por stress oxidativo e, por outro lado, é bem conhecida a interferência do alumínio no equilíbrio entre factores prooxidantes e antioxidantes ao nível celular (Kong *et al.*, 1992; Gupta & Shukla, 1995; Farooqui *et al.*, 1997; Verstraeten *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 1999; Farooqui & Horrocks, 2001; Ward *et al.*, 2001). É necessária uma análise detalhada do metabolismo e tráfego da fosfatidiletanolamina para estabelecer a natureza específica da interferência do alumínio com a fosfatidiletanolamina, uma vez que a alteração da razão molar fosfatidiletanolamina/fosfolípidos totais dos sinaptossomas constitui um indicador de instabilidade e de propriedades anormais da membrana (Moesgaard *et al.*, 2000).

A razão  $CH/PL_{\text{totais}}$  é considerada um factor determinante para a integridade da membrana e é inversamente proporcional à fluidez de membrana. A intercalação das moléculas de colesterol entre as cadeias acil dos fosfolípidos adjacentes, que restringe o empacotamento dos fosfolípidos (Weis & Haug, 1989; Verstraeten *et al.*, 1997), pode facilitar a interacção do alumínio com os fosfolípidos polares e com as moléculas

transportadoras. Numerosos estudos relatam a alteração do teor em colesterol das membranas celulares durante o envelhecimento (Calderini *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1991; Igbavboa *et al.*, 1996), a alteração da fluidez de membrana em pacientes com a Doença de Alzheimer (Zubenko, 1990; Collins *et al.*, 1991; Van Rensburg *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999) e a acumulação de alumínio no cérebro associada à Doença de Alzheimer e ao envelhecimento (McDermott *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1998). Por conseguinte, é importante investigar a relevância fisiológica do efeito da razão molar de CH/PL<sub>totais</sub> na acumulação de alumínio a nível celular (Figuras III.15 e 16), uma vez que a acção modeladora do colesterol em inúmeras proteínas integrais da membrana é mediada por mecanismos diversos (Brown & London, 1998; Simons & Toomre, 2000; Fielding, 2001; Haines, 2001; Nicholls & Lippincott-Schwartz, 2001; Stoffel-Wagner, 2001; Zajchowski & Robbins, 2002).

A fluidificação induzida, *in vivo*, pelo alumínio na membrana plasmática sináptica (Figura III.20.B) não pode ser explicada pela eficácia do alumínio em promover agregação e fusão dos fosfolípidos carregados negativamente, que parece promover rigidificação e não a fluidificação das biomembranas (Ohba *et al.*, 1994; Julka & Gill, 1996; Verstraeten *et al.*, 1997; Verstraeten & Oteiza, 2000). Além disso, nas nossas condições experimentais, a incubação *in vitro* de sinaptossomas com AlCl<sub>3</sub>, em concentrações na ordem dos micromolar, originou a rigidificação da membrana sinaptossomal, especialmente ao nível da região hidrofílica (Figura III.19). Esta observação está de acordo com os resultados obtidos noutros laboratórios (Van Rensburg *et al.*, 1992; Ohba *et al.*, 1994; Verstraeten *et al.*, 1997; Zatta *et al.*, 1997; Verstraeten *et al.*, 2002). Assim, além da capacidade do Al<sup>3+</sup> promover a formação de agregados de fosfolípidos carregados negativamente, durante a exposição *in vivo*, o alumínio também promove modificações que conduzem ao aumento da mobilidade molecular no interior da membrana plasmática sináptica. Também Pandya e colaboradores (2001) observaram uma fluidificação da membrana plasmática sináptica de ratos sujeitos a exposição crónica a alumínio. Um efeito global fluidificante semelhante foi observado em plaquetas, em resposta à exposição a alumínio, tendo sido interpretado como reflectindo o aumento, induzido pelo alumínio, da contribuição do retículo endoplasmático para o sinal de polarização de fluorescência do DPH (Van Rensburg *et al.*, 1992). No presente trabalho, o DPH e o TMA-DPH foram usados como sondas para monitorizar a fluidez de membrana. As alterações mais marcantes induzidas pelo alumínio na fluidez de

membrana foram observadas com o TMA-DPH (Figura III.17), cuja ligação à membrana plasmática é mais forte do que a do DPH, devido à ancoragem de superfície ser mediada pelo substituto catiónico trimetilamónio (Kuhry *et al.*, 1983). Além disso, não foram detectadas alterações no sinal de fluorescência durante o período de quantificação. A fluidificação das membranas dos sinaptossomas, isolados a partir de córtex cerebral de rato após exposição *in vivo* a alumínio, parece correlacionar-se com a enorme redução da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> na membrana plasmática (Figura III.20).

A síntese e utilização do colesterol estão rigorosamente reguladas, devido ao papel desta molécula na estrutura e função das biomembranas. A reacção catalisada pela HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) redutase é o passo limitante da biossíntese do colesterol. Esta enzima é regulada por um complexo mecanismo, que envolve vias de sinalização mediadas por AMP cíclico (Bloch, 1965; Goldstein & Brown, 1990). Em suma, um aumento da produção do AMP cíclico promove a inactivação da HMG-CoA redutase e consequente diminuição da síntese de colesterol. Recentemente, foi demonstrado que a ligação e transferência do colesterol das biomembranas para as apolipoproteínas, o passo inicial do transporte reverso (contrafluxo) do colesterol, é modulado pelo AMP cíclico (Bortnick *et al.*, 2000). Estes mecanismos podem ser relevantes para explicar a diminuição na razão molar CH/PL<sub>totais</sub> na membrana sináptica plasmática induzida pelo alumínio (Figuras III.15 e 16), pois a elevação dos níveis de AMP cíclico aparece associada à neurotoxicidade do alumínio (Jope & Johnson, 1992). Vários estudos são concordantes com a hipótese de que a interacção do alumínio com elementos das vias de transdução de sinal são, aparentemente, eventos iniciais das lesões celulares resultantes da exposição a alumínio (Cochran *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1990; Haug *et al.*, 1994; Shafer & Mundy, 1995; Yokel, 2000). A aparente baixa permutabilidade do colesterol nas membranas neuronais quando comparada com a registada noutros sistemas de biomembranas (Nemecz *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1990; Schroeder *et al.*, 1991, 1995; Rao *et al.*, 1993), tal como a especificidade da homeostasia do colesterol no cérebro (Dietschy & Turley, 2001), podem contribuir para a explicar os diferentes efeitos do alumínio na fluidez de membrana e na actividade funcional das membranas de diferentes origens. Como a microviscosidade da membrana é essencial para o funcionamento neuronal, uma alteração na razão molar CH/PL<sub>totais</sub> por intoxicação por alumínio, pode causar desempenho insuficiente a nível cerebral. Em particular, a alteração induzida por alumínio na razão molar CH/PL<sub>totais</sub> dos

sinaptossomas pode modificar os domínios ricos em colesterol no interior da membrana sináptica plasmática. Estes domínios da membrana são especialmente importantes para a transdução de sinais, processos de transporte, adesão, crescimento e apoptose (Masserini *et al.*, 1999; Simons & Ikonen, 2000).

Em conclusão, em sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral do rato após administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia), a capacidade de acumulação de alumínio correlaciona-se com as alterações na composição da membrana em colesterol e com os parâmetros de ordem dos lípidos, que, por sua vez, dependem do conteúdo em alumínio dos sinaptossomas. Por outro lado, o efeito fluidificante ao nível da membrana plasmática sináptica induzido por administração, *in vivo*, de  $\text{AlCl}_3$  (Figura III.17 e 20.B), não foi observado quando os sinaptossomas foram incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$  (Figura 19). De facto, nestas condições, verificou-se a diminuição da fluidez de membrana, de uma maneira dependente de concentração e independente da razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$ .

### ***3. O alumínio reduz a activação adicional da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ por concentrações elevadas de ATP***

O efeito inibitório do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal anteriormente descrito (págs. 117 e 119), foi também observado quando os sinaptossomas foram incubados na presença de  $\text{AlCl}_3$  (Figura III.22).

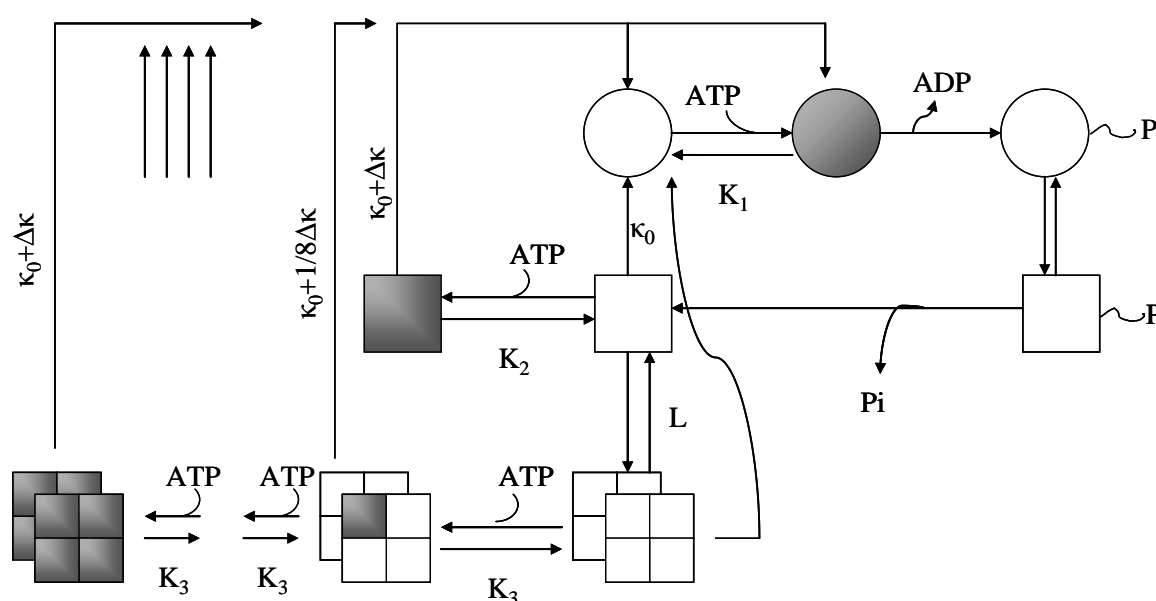
A ubaína é o inibidor mais utilizado para distinguir a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (EC 3.6.3.9) das demais fosfohidrolases presentes nas amostras biológicas. A sensibilidade a ubaína da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de diferentes origens está bem estabelecida (Blanco & Mercer, 1998). Na Figura III.21, que representa a dependência da actividade hidrolítica de ATP em função da concentração de ubaína, está patente o perfil típico da curva “dose-resposta” para a inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pela ubaína (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1994). A exposição a alumínio ( $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ ) não modificou a sensibilidade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal à ubaína (Figura III.21), tal como já tinha sido evidenciado por Caspers e colaboradores (1994), que demonstraram que o  $\text{AlCl}_3$  não modifica a afinidade para a ligação da ubaína até concentrações de 100  $\mu\text{M}$ . Do mesmo modo, a presença de alumínio no meio de reacção não modificou a concentração de ubaína necessária ( $> 1 \text{ mM}$ ) para inibir totalmente a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal.

A actividade sensível a ubaína,  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , foi inibida por  $\text{AlCl}_3$ , de uma maneira dependente de concentração (Figura III.22). Na presença de  $\text{Mg-ATP}$   $500\ \mu\text{M}$ , que corresponde à concentração saturante nas condições experimentais utilizadas, registou-se o efeito inibitório máximo ( $\sim 60\%$ ) da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  após incubação com  $\text{AlCl}_3$   $300\ \mu\text{M}$ . Na presença de  $\text{AlCl}_3$   $30\ \mu\text{M}$  foi observada uma inibição significativa ( $p < 0.01$ ) de  $30\%$ , enquanto que para concentrações superiores a  $75\ \mu\text{M}$  foi verificado um efeito inibitório quase máximo. Estes resultados, obtidos em sinaptossomas previamente congelados, confirmam que a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é sensível a  $\text{AlCl}_3$  na gama de concentrações micromolares (Caspers *et al.*, 1994). Usando sinaptossomas intactos, são necessárias concentrações mais elevadas de  $\text{AlCl}_3$  (Lai *et al.*, 1980a) ou períodos mais longos de incubação (Caspers *et al.*, 1994) para inibir a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na mesma extensão, sugerindo que a acumulação de alumínio nos sinaptossomas deve preceder o efeito inibitório.

É interessante notar que a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  não é inibida por  $\text{AlCl}_3$  na presença de concentrações baixas, não saturantes, de  $\text{Mg-ATP}$  (Figura III.22). O facto do alumínio se ligar ao ATP com uma afinidade mais elevada do que o magnésio (Martin, 1986; van Rensburg *et al.*, 1997) e o complexo Al-ATP ter sido identificado no citoplasma dos eritrócitos (Panchalingam *et al.*, 1991), não implica que o complexo Al-ATP compita com o  $\text{Mg-ATP}$  para a ligação ao centro catalítico. Pelo contrário, há evidências de que o complexo Al-ATP não é responsável pela inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida pelo  $\text{AlCl}_3$ , uma vez que o  $\text{AlCl}_3$  actua como um inibidor não competitivo reversível relativamente ao ATP, quando o  $\text{MgCl}_2$   $2\ \text{mM}$  e  $\text{AlCl}_3$   $100\ \mu\text{M}$  estão presentes simultaneamente no meio de reacção (Caspers *et al.*, 1994). Além do mais, nas nossas condições experimentais, a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida pelo  $\text{AlCl}_3$  permaneceu inalterada, quando a concentração de  $\text{MgCl}_2$  no meio de incubação foi aumentada até  $60\ \text{mM}$  (Figura III.23).

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é composta por igual quantidade estequiométrica de dois polipeptídeos, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e um terceiro componente não obrigatório, a subunidade  $\gamma$ . Tal como anteriormente descrito (pág. 12), quando integrada na membrana plasmática, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  apresenta uma estrutura oligomérica de protómeros  $\alpha\beta$ , as unidades funcionais responsáveis pelo transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e pela actividade catalítica

(Takeda & Kawamura, 2001). A análise comparativa dos parâmetros cinéticos, calculados a partir das curvas “substrato-velocidade” da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em diferentes condições, foi anteriormente usada para demonstrar que a estrutura quaternária é importante para o comportamento cinético da enzima (Boldyrev & Fedosova, 1990; Lopina *et al.*, 1995; Boldyrev & Kurella, 1996; Kurella *et al.*, 1997; Dobrota *et al.*, 1999) (Figura IV.1).



**Figura IV.1.** Efeito da oligomerização no comportamento cinético da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

Os estados conformacionais da enzima,  $E_1$  e  $E_2$  são representados por, respectivamente, círculos e quadrados. O sombreamento representa as subunidades ligadas ao ATP.  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$ , constantes de equilíbrio da ligação de baixa afinidade do ATP às subunidades;  $L$ , constante de equilíbrio do processo de oligomerização;  $\text{Pi}$ , fosfato inorgânico;  $\kappa_0$ , constante cinética de conversão de  $E_2$  para  $E_1$  (adaptado de Boldyrev *et al.*, 1991).

A dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal em função da concentração de  $\text{Mg-ATP}$  (Figura III.24, linha O-O) afastou-se do padrão hiperbólico, exibindo um “plateau” intermédio, ilustrando os efeitos, de alta e baixa afinidade, do ATP na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada na membrana sinaptossomal. A análise detalhada da actividade, dependente de ATP, da enzima solubilizada e da enzima integrada em membranas, mostrou que a cooperatividade negativa observada na presença de ATP é inerente ao protómero  $\alpha\beta$ , e representa o efeito do nucleotídeo ao nível dos locais de ligação de alta afinidade (Ward & Cavieres, 1993). Por outro lado, a cooperatividade

positiva na ligação de baixa afinidade do ATP reflecte a capacidade do ATP acelerar o passo limitante do ciclo enzimático, que parece ser grandemente comprometido sob condições que favorecem a desorganização das interações inter-protoméricas no seio do complexo oligómero, que constitui a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  quando inserida na membrana plasmática (Boldyrev & Fedosova, 1990).

A incubação de sinaptossomas congelados/descongelados com  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ , concentração que promoveu a inibição máxima (Figura III.22), reduziu drasticamente a activação adicional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por concentrações elevadas de Mg-ATP (>150  $\mu\text{M}$ ), enquanto que a dependência da actividade enzimática em função da concentração do substrato permaneceu inalterada na gama de baixas concentrações de Mg-ATP (<20  $\mu\text{M}$ ) (Figura III.24, linha ●-●). Os ensaios da dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP efectuados com sinaptossomas congelados/congelados, isolados a partir do córtex cerebral dos ratos pertencentes ao grupo de exposição a  $\text{AlCl}_3$ , revelaram que a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  parece produzir uma modificação idêntica no comportamento cinético da enzima (Figura III.24, linha  $\Delta$ - $\Delta$ ). De facto, na gama de concentrações de Mg-ATP inferiores a 75  $\mu\text{M}$ , a curva que caracteriza a dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP, após exposição crónica a  $\text{AlCl}_3$  foi coincidente com a obtida na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ , e exibiu uma menor redução da activação da enzima pelas concentrações mais altas de Mg-ATP (>150  $\mu\text{M}$ ). Ainda assim, na presença de concentrações saturantes de substrato, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi inibida significativamente (32%). É importante notar que, nestas condições experimentais, a redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  reflecte a acção do alumínio durante o período de exposição, uma vez que não foi adicionado ao meio de reacção. Tal como referido anteriormente (pág. 113), a administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia) causou um aumento de 1,7 vezes do conteúdo em  $\text{Al}^{3+}$  da fracção sinaptossomal. É interessante notar que Sarin *et al.* (1997a, b) observaram uma diminuição significativa (80%) na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida por exposição crónica do macaco a alumínio, que provocou um aumento de 1,9 vezes na acumulação de  $\text{Al}^{3+}$  no córtex cerebral. Por conseguinte, a redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal após exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ , bem como os resultados apresentados na

Figura III.23, indicam que a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por  $\text{AlCl}_3$  não pode ser atribuída à formação do complexo  $\text{Al-ATP}$  nas condições experimentais utilizadas.

O mecanismo do efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal foi caracterizado com recurso a uma equação que consiste na combinação de dois termos de Hill, que correspondem a uma modificação da equação inicialmente proposta por Boldyrev e colaboradores (Boldyrev & Kurella, 1996; Boldyrev *et al.*, 1991) (ver “Materiais e métodos”). Verificou-se que o valor de  $n_H$  (coeficiente de Hill da reacção hidrolítica) permaneceu inalterado após a exposição a  $\text{AlCl}_3$ , apresentando valores de 0,7 (condição controlo), 0,8 (exposição *in vitro*) e 0,8 (exposição *in vivo*). Pelo contrário, os valores de  $n$  (número máximo de protómeros que interagem no conjunto oligomérico) foram alterados significativamente após exposição *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$ . A exposição a alumínio induziu uma diminuição de 1,5 vezes no valor de  $n$ , tendo sido obtidos valores de 8,0 (condições controlo), 5,5 (exposição *in vitro*) e 5,4 (exposição *in vivo*). Por outro lado, a reacção da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  decorreu à  $V_{\text{máx}}$  (velocidade máxima da reacção global) de 281 nmol Pi/min/mg proteína na condição controlo, enquanto que após exposição *in vitro* e *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  os valores de  $V_{\text{máx}}$  foram, respectivamente, 78 e 154 nmol Pi/min/mg proteína. Os resultados obtidos parecem indicar que nestas condições experimentais, o alumínio pode interferir com o passo limitante da reacção global de ATPase na presença de concentrações de ATP não limitantes e com as interacções inter-protoméricas no conjunto oligomérico da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada na membrana sinaptossomal. Esta conclusão é também apoiada pela observação prévia de que a exposição de sinaptossomas *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  não modificou a activação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Caspers *et al.*, 1994).

Apenas os nucleótidos que possuem adenina e cisteína podem promover activação adicional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , através da interacção com os locais de ligação dos nucleótidos de alta e baixa afinidade (Boldyrev & Svinukhova, 1982; Thoenges *et al.*, 1999). Tal como pode ser observado na Figura III.25, quando o UTP foi usado em substituição do ATP, não foi observada cooperatividade positiva para uma gama alargada de concentrações de substrato, e o curso da reacção enzimática permaneceu inalterado na presença de  $\text{AlCl}_3$ . Estes resultados estão de acordo com os apresentados nas Figuras III.22 e III.24, onde o efeito inibitório do alumínio não foi observado na presença de concentrações baixas de ATP, e, desse modo, constitui uma evidência adicional da



interferência do alumínio com a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  ao nível dos locais de ligação de baixa afinidade mais do que ao nível da fosforilação da enzima, que requer baixas concentrações de ATP e ocorre na presença de UTP.

Apesar do mecanismo exacto subjacente à redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida pelo  $\text{AlCl}_3$  não ter sido completamente descrito, estes resultados demonstram claramente que ambas as exposições, *in vivo* e *in vitro*, a alumínio produziram apenas uma inibição parcial da actividade da enzima na presença de elevadas concentrações de ATP ( $> 150 \mu\text{M}$ ), enquanto que para baixas concentrações de ATP ( $< 20 \mu\text{M}$ ) ou quando o UTP foi usado como substrato a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  não foi inibida. Adicionalmente, as exposições *in vivo* e *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  diminuíram o número de protómeros que interagem (Figura III.24), o que parece indicar que em sinaptossomas, previamente congelados e descongelados, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  encontra-se principalmente no estado de elevada oligomerização (octómero) e na presença de  $\text{AlCl}_3$  predomina a forma tetraprotomérica. É interessante notar que estudos detalhados da interacção nos oligómeros indicam que a unidade funcional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na membrana plasmática de diferentes origens é a composição tetraprotomérica de subunidades  $\alpha$ - $\beta$  (Taniguchi *et al.*, 2001). Neste trabalho, a exposição *in vivo* e a exposição *in vitro* (incubação durante 5 min com  $\text{AlCl}_3$ ) foram igualmente eficientes a promover a redução da interacção inter-protomérica [ $n=5,5$  (exposição *in vitro*) e  $n=5,4$  (exposição *in vivo*)].

De acordo com o modelo de Albers-Post (Figura I.2), o passo limitante no ciclo catalítico de cada unidade protomérica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é a transição de conformação de  $E_2(K_2)$  para a conformação  $E_1$ . Este passo é acelerado pela ligação do ATP a locais de ligação de baixa afinidade da enzima no estado conformacional  $E_2$  (Mimura *et al.*, 1993; Thoenges *et al.*, 1999). O efeito estimulatório do ATP é mais pronunciado quando a enzima se encontra estruturada em complexos oligoméricos, uma vez que a conformação  $E_2$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  oligomérica possui maior afinidade para o ATP do que quando na forma protomérica (Boldyrev & Fedosova, 1990; Boldyrev *et al.*, 1991). Caspers e colaboradores (Caspers *et al.*, 1990; 1993; 1994) sugeriram que o alumínio estabiliza a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no estado conformacional  $E_2$  fosforilado, pois o  $\text{AlCl}_3$  estimula a ligação da ubaína à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sem alterar a afinidade da ligação. Goldshleger e Karlish

demonstraram que o  $\text{Fe}^{2+}$ , quando presente em concentrações elevadas, induz a redução da velocidade de transição de  $E_2$  para  $E_1$  (Goldshleger & Karlish, 1999).

Uma vez que tanto a exposição *in vivo* como a exposição *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  produziram um efeito inibitório na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  com as mesmas características principais, seria interessante saber se o alumínio interage com a molécula da enzima e discernir se o efeito do alumínio é directo na estrutura da enzima ou se, pelo contrário, modifica indirectamente a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Sweadner, 1992; Blanco & Mercer, 1998; Lopina, 2000; Mobasheri *et al.*, 2000; Therien & Blostein, 2000; Boldyrev, 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Apesar do mecanismo molecular das interacções inter-protoméricas não estar completamente esclarecido, foi sugerido que a estabilidade dos oligómeros depende da oxidação das ligações S-S dos resíduos de cisteína, localizados na ansa entre os segmentos transmembranares  $\text{M}_1\text{-M}_2$ ,  $\text{M}_4\text{-M}_5$ , e  $\text{M}_8\text{-M}_{10}$  (Koster *et al.*, 1995; Sarvazyan *et al.*, 1995; Sweadner & Donnet, 2001). Anteriormente foi observada a existência de correlação temporal entre o desenvolvimento dos processos de inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  do cérebro e do rim por espécies reactivas de oxigénio e de diminuição do número de grupos SH da enzima (Boldyrev *et al.*, 1997; Kurella *et al.*, 1999). Durante a referida inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foram também observadas alterações nos parâmetros cinéticos, consistentes com quebra da interacção protómero-protómero.

A Figura III.27 mostra que a incubação dos sinaptossomas, previamente congelados/descongelados, com  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  produz uma redução ligeira (24%), mas significativa ( $p < 0,001$ ) da concentração dos grupos sulfidrilo, determinada pela reacção colorimétrica com DTNB. Nas preparações biológicas, a ligação do alumínio no estado de oxidação 3+ ( $\text{Al}^{3+}$ ) é essencialmente de natureza electrostática e ocorre preferencialmente com ligandos dadores de oxigénio e não com grupos sulfidrilo (Martin, 1986). Porém, Katyal *et al.* (1997) observaram uma diminuição dos tióis do cérebro e da actividade da ATPase durante a administração oral crónica de alumínio (Katyal *et al.*, 1997). É importante relembrar que não foi possível observar uma redução significativa na concentração de grupos SH após a administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia), mas sim a facilitação da reacção com DTNB (Figura III.12). Porém,

como os grupos SH foram quantificados nos sinaptossomas, estes resultados devem ser interpretados como indicativos da capacidade do  $\text{AlCl}_3$  diminuir o número dos grupos de sulfidrilo reactivos e aumentar a sua acessibilidade ao DTNB, e não como uma evidência directa da oxidação efectiva dos resíduos de cisteína da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida pelo  $\text{AlCl}_3$ .

Estudos anteriores demonstraram que a modificação oxidativa da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  proporciona a redução da velocidade de hidrólise de ATP e da transição da conformação  $E_1 \rightarrow E_2$ , para além de prevenir a oligomerização (Huang *et al.*, 1994; Boldyrev *et al.*, 1997; Kurella *et al.*, 1997; 1999; Lehotsky *et al.*, 1999). É interessante notar que as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , e  $\alpha_3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  revelaram resistências distintas à oxidação por radicais livres, o que parece estar relacionado com a localização dos resíduos de cisteína ao longo do polipeptídeo. A isoforma  $\alpha_1$  contém menos resíduos de cisteína expostos ao citoplasma e é mais resistente a danos oxidativos e menos sensível a ubaína, enquanto que as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  exibem mais grupos sulfidrilo expostos ao espaço intracelular e maior sensibilidade à ubaína e ao stress oxidativo (Vasilets & Schwarz, 1993; Kurella *et al.*, 1995). Por outro lado, as múltiplas isoenzimas exibem propriedades cinéticas diferentes que conferem à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  competências funcionais distintas nos diferentes tecidos e tipos de células (ver Blanco & Mercer, 1998; Cornelius & Mahmmoud, 2003; Jorgensen *et al.*, 2003; Kaplan, 2002; Mobasher *et al.*, 2000, para revisões recentes). Por conseguinte, é lógico supor que a eventual ocorrência de oxidação dos resíduos de cisteína da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , induzida pelo  $\text{AlCl}_3$ , e/ou a alteração nos níveis de expressão das diferentes isoformas da subunidade catalítica, provoquem alterações distintas na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da sua composição em isoformas.

Neste trabalho demonstrou-se que os níveis de expressão proteica da subunidade catalítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  não diminuíram no rim, no coração e no cérebro do rato após administração de 3,60 g de  $\text{AlCl}_3$  ao longo de 4 meses (0,03 g  $\text{AlCl}_3$ /dia). A análise quantitativa das curvas “dose-resposta” da ubaína e a análise por imunodeteção, usando anticorpos directamente contra sequências específicas de aminoácidos das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  das isoformas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figuras III.28, 29, 31 e 32), revelaram que a exposição a alumínio não modificou nem a expressão relativa de cada uma das isoformas

da subunidade catalítica nem o padrão de expressão das isoformas característico de cada tecido. A diminuição da expressão ao nível de uma das isoformas é normalmente compensada pelo aumento da expressão doutra isoforma (Charlemagne *et al.*, 1994) ou é acompanhada por diminuição simultânea dos níveis de todas as isoformas, apesar de cada isoforma ser codificada por um gene diferente (Serluca *et al.*, 2001).

O padrão de expressão das isoformas da subunidade  $\alpha$  após exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  não revelou qualquer alteração que possa justificar as diferenças observadas na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figuras III.13 e 30). Esta parece ser a primeira demonstração experimental de que a diminuição da actividade máxima da enzima induzida pelo alumínio não pode ser atribuída à redução do nível de expressão da subunidade catalítica. Estes resultados combinados com a similaridade marcante do efeito *in vivo* e *in vitro* do alumínio já descrito (Figura III.24), suportam a hipótese de que o alumínio actua nos mecanismos pós-translacionais de regulação ou interage directamente com a enzima.

Nas nossas condições experimentais, o alumínio inibiu as três isoformas da subunidade catalítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , o que é inconciliável com a hipótese da acção inibitória do alumínio ser mediada pelas proteínas FXYD. Estas subunidades reguladoras modificam as afinidades do  $\text{Na}^+$  e/ou do  $\text{K}^+$  da enzima e a sua acção é específica para determinados protómeros  $\alpha\beta$  e tecidos (Cornelius & Mahmoud, 2003). Além do mais, não foram observadas alterações na activação da enzima por  $\text{Na}^+$  (Caspers *et al.*, 1994). Tal como referido anteriormente, o alumínio não parece interagir directa ou indirectamente com os locais de ligação do  $\text{Na}^+$ , do  $\text{K}^+$  e com os locais de ligação de ATP de alta afinidade, o que torna improvável a ocorrência do rearranjo não covalente do protómero  $\alpha\beta$  durante a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ . Tipicamente, diferentes combinações  $\alpha\beta$  das subunidades com a mesma subunidade catalítica diferem no controlo da biossíntese e em propriedades, tais como as afinidades para os iões de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e para o ATP (Geering, 2001). Além disso, os locais de ligação para o ATP e catiões estão localizados na subunidade  $\alpha$  e apenas os protómeros  $\alpha\beta$  são capazes de exibir a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . A redução, induzida por  $\text{AlCl}_3$ , da actividade da ATPase em condições que favorecem a activação máxima da enzima (Figuras III.13 e 30), e consistentemente observada por outros autores (Caspers *et al.*, 1994; King *et al.*, 1983; Lai *et al.*, 1980a; Lal *et al.*, 1993; Rao, 1992; Sarin *et al.*, 1997a), é difícil de reconciliar com a simples

dissociação, induzida por alumínio, das unidades protoméricas  $\alpha\beta$ , pois o efeito inibitório do alumínio requereu a presença de elevadas concentrações de ATP e não ocorreu quando UTP foi usado como substrato hidrolítico (Figura III.25).

Dos dados obtidos é evidente que a acção inibitória do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  resiste ao fraccionamento celular (isolamento de sinaptossomas) e ao ciclo de congelação/descongelação, o que parece implicar que este permanece na fracção membranosa. É interessante lembrar que *in vitro* são necessárias concentrações muito mais elevadas (na ordem dos micromolar) e a extensão da acção inibitória parece ser dependente do tempo (Caspers *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1980). Tendo em consideração todas estas observações, os resultados sugerem que a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  parece envolver a ligação do alumínio a locais de alta afinidade e baixa acessibilidade. De facto, foi já sugerido que após exposição *in vivo* a alumínio, elevadas quantidades de alumínio permanecem ligadas a proteínas de elevado peso molecular (Julka *et al.*, 1996).

A realização de ensaios de exposição a  $\text{AlCl}_3$  *in vivo* e *in vitro* foi também crucial para estabelecer a relação entre as alterações da fluidez de membrana (Figuras III.10, 17, 19 e 20.B) e da razão molar  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  (Figuras III.15 e 20.A) e o efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Figuras III.13, 22 e 24). O alumínio *in vivo* evidenciou um comportamento global fluidificante ao nível da membrana plasmática sináptica, enquanto que *in vitro* produziu o efeito contrário, isto é, observou-se a diminuição da fluidez de membrana, de uma maneira dependente de concentração e independente da razão molar  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$ . De facto, não ocorreu modificação da razão molar  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  durante a incubação dos sinaptossomas na presença de  $\text{AlCl}_3$ , sendo esta modificada durante a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ . Por outras palavras, o efeito inibitório do alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  manteve-se quando a fluidez de membrana aumentou (Figuras III.10, 17 e 20.B) e a razão molar  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  diminuiu (Figuras III.15 e 20.A). Sinensky e colaboradores (1979) observaram a existência de correlação entre o aumento da ordem lipídica, induzida pelo aumento de colesterol e a diminuição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em células CHO. Também foi observado, *in vivo*, que a diminuição dos níveis de colesterol nas membranas dos eritrócitos e das plaquetas é acompanhada de um aumento das respectivas actividades de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Lijnen *et al.*, 1994). Rajasekaran *et al.* (2004) atribuíram a inibição (~40%) da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  ao aumento

(de 0,64 para 0,70) da razão molar CH/PL<sub>totais</sub> e ao aumento (de 153,3 para 172,6 µg/mg de proteína) da concentração de colesterol nos eritrócitos do rato tratados com butationa sulfoximina. O estudo efectuado não monitorizou as alterações da viscosidade e da concentração do colesterol no microambiente lipídico que envolve a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, que parecem afectar o rearranjo estrutural da enzima durante o ciclo catalítico (Cornelius, 2001). De qualquer modo, a característica fundamental do efeito inibitório do alumínio na actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, nomeadamente a ausência de activação adicional da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase por concentrações elevadas de ATP (Figura III.24) manteve-se inalterada independentemente do tipo de exposição a alumínio (*in vivo* ou *in vitro*).

Julka & Gill (1996) também observaram que a exposição, *in vitro* e *in vivo*, a Al<sup>3+</sup>, produziu a diminuição da actividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase dos sinaptossomas isolados a partir de zonas distintas do cérebro (Julka & Gill, 1996). Uma vez que a quelação do alumínio pela desferroxamina repôs a actividade da enzima, os autores concluíram que o Al<sup>3+</sup> pode interagir directamente com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Esta enzima, tal como a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, sofre uma sequência de transições entre as conformações *E<sub>1</sub>* e *E<sub>2</sub>* durante o ciclo de bombeamento, que requer rearranjos estruturais profundos (Sweadner & Donnet, 2001). A administração *in vivo* de desferroxamina, usada habitualmente no tratamento dos pacientes com intoxicação aguda por alumínio, parece preservar a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase durante a reperusão após hipóxia-isquémia (Nakamura *et al.*, 2000), induzir a recuperação da actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase após hemorragia subaracnóide experimental (Bilgihan *et al.*, 1994) e reverter os efeitos neurotóxicos induzidos pelo alumínio (Savory *et al.*, 1998).

Em condições fisiológicas normais, as concentrações de ATP submembranares são superiores a 100 µM (Ferrari *et al.*, 1997; Gribble *et al.*, 2000), garantindo a activação máxima da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. Adicionalmente, a estimulação de sinaptossomas isolados a partir de cérebro de rato aumenta a velocidade de produção de ATP sensível a ubaína (Erecinska & Silver, 1989; Erecinska *et al.*, 1994a, b). De facto, a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase é essencial para a rápida recuperação do gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, que constitui a força motriz do transporte de neurotransmissores para os terminais nervosos. Porém, a extensão da inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, induzida pela administração de 3,60 g de AlCl<sub>3</sub> ao longo de 4 meses (0,03 g AlCl<sub>3</sub>/dia), foi insuficiente para modificar a acumulação activa de GABA pelos sinaptossomas intactos (Figura III.14). No entanto, a

presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  no meio de incubação reduziu (38%) a quantidade de GABA acumulado (Figura III.26). Na presença simultânea de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  e ubaína 50  $\mu\text{M}$  no meio de incubação, a extensão de redução máxima da acumulação de GABA permaneceu praticamente inalterada. Estes resultados sugerem que o efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , exercido tanto ao nível da actividade hidrolítica como da actividade de transporte, pode comprometer o funcionamento dos sistema de transporte activo secundário presentes na membrana pré-sináptica desde que o grau de inibição seja elevado. De facto, outros investigadores observaram que o alumínio inibe a acumulação (40 - 50%) de GABA, glicina, glutamato, colina, dopamina, noradrenalina e 5-hidroxitriptamina por sinaptossomas isolados a partir de zonas distintas do cérebro (Lai *et al.*, 1978; 1980b; Wong *et al.*, 1981; Lai *et al.*, 1982; Sturman *et al.*, 1983; Shouffani & Kanner, 1990; Erasmus *et al.*, 1993; Meiri *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 1994; Strong *et al.*, 1996; Yokel, 2000). Nayak e Chatterjee (2003) verificaram que a administração intraperitonial diária de  $\text{AlCl}_3$  (2 mg/kg de peso corporal) durante 4 semanas não alterou significativamente o conteúdo em GABA em várias regiões cerebrais. No entanto, El-Rahman (2003) observou a diminuição dos níveis de GABA no cérebro do rato em função da dose de sulfato de alumínio administrada. Estes resultados, aparentemente contraditórios, podem ser explicados pelas diferenças das doses e tempos de exposição, que, por sua vez, podem induzir graus de inibição diferentes da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

No modelo experimental usado não foram observadas mudanças significativas na libertação de LDH, nos níveis de ATP/ADP e nos valores de ECP (Tabelas III.3 e 4). O fornecimento adequado de energia para a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  parece ter sido assegurado durante o protocolo de exposição *in vivo* a alumínio. De facto, poder-se-á considerar que a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (o maior consumidor de energia na célula) é favorável para preservar elevado o ATP intracelular. É cada vez mais reconhecido que, dependendo da intensidade/duração dos parâmetros de insulto, o alumínio pode produzir morte celular por apoptose ou necrose (Johnson *et al.*, 2005), e a manutenção dos níveis de ATP é necessária para a morte celular por apoptose (Kim *et al.*, 2003). Savory e colaboradores (2003) demonstraram que agentes que interferem com a cascata de apoptose, mediada pela mitocôndria e/ou pelo retículo endoplasmático, têm a capacidade de prevenir a apoptose induzida por alumínio no cérebro de coelho, o que está de acordo com a ideia

de que, modificações na homeostasia intracelular do cálcio e a potenciação da acção pro-oxidante dos metais de transição podem mediar efeitos tóxicos durante a exposição crónica a alumínio. Julka e Gill (1996) observaram que a adição exógena de glutathione, um antioxidante endógeno, pode reverter apenas parcialmente a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase após a administração *in vivo* de alumínio, enquanto que a desferroxamina, um quelante de alumínio, produz a reversão total. Assim, a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pode ser interpretada como uma forma das células sinalizarem a eventual morte celular através da via apoptótica (Yu, 2003).

Aparentemente, a inibição parcial da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  induzida, *in vivo*, por alumínio poderia promover uma redução constante da actividade da enzima independente das diferenças subtis na adaptação da actividade celular da enzima a requisitos fisiológicos específicos. Em vez disso, a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  previne o efeito estimulatório produzido pela ligação, de baixa afinidade, de ATP (Figura III.24) e parece reduzir especificamente a sensibilidade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  às concentrações submicromolares de ubaína (Figuras III.29.A e 32.A). De acordo com vários investigadores, ambas as características, a inibição por ubaína de elevada sensibilidade e o efeito estimulatório do ATP, são ainda mais evidentes quando a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  exhibe níveis elevados de oligomerização (Boldyrev, 2001; Laughery *et al.*, 2004). A capacidade de ligação de alta afinidade de esteróides cardiotónicos à enzima é relevante para a transdução de sinal mediada pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada nos *caveolae* (Xie & Cai, 2003). As ligações químicas estabelecidas entre os protómeros  $\alpha$ - $\beta$  activos vizinhos (oligomerização) é um processo específico, que confere maior sensibilidade às alterações na microviscosidade e às moléculas de sinalização (Boldyrev, 2001). A presença da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  nos *caveolae*, fornece uma explicação da importância das interacções multiméricas entre os conjuntos protoméricos activos, uma vez que estes domínios lipídicos constituem unidades morfológicas e funcionais da membrana, envolvidas em vias de sinalização intracelulares que se iniciam ao nível da membrana plasmática. A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  origina, em função do tipo de célula, a activação de múltiplas vias de sinalização (por exemplo, as vias mediadas pela MEK/MAPK-ERK e por proteíno-cinases da família Src), a produção subsequente de espécies reactivas de oxigénio e as oscilações



do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediadas pelo receptor de 1,4,5-trifosfato inositol do retículo endoplasmático (Xie & Cai, 2003).

Enquanto que permanece por clarificar se a extensão da inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pode ser suficiente para causar danos severos no funcionamento dos terminais nervosos, há evidências que indicam que a redução da actividade desta enzima contribui para iniciar ou acentuar a patogénese de um elevado número de desordens do sistema nervoso central, incluindo trauma cerebral, isquémia, Doença de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Lees, 1991; Calabresi *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996; Ross & Soltesz, 2000; Kempinski, 2001; Ellis *et al.*, 2003).

Em conclusão, os resultados apresentados mostram que a administração diária, por via oral, de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$ , durante 120 dias, a ratos Wistar, machos com um mês de idade e ~250 g de peso à data do início da exposição, provocou um aumento de ~7 ng  $\text{Al}^{3+}$ /mg de proteína na concentração total de  $\text{Al}^{3+}$  nos terminais pré-sinápticos isolados do córtex cerebral e a inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . A diminuição total (~30%) da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é assegurada pela inibição parcial das isoenzimas que contêm as subunidades catalíticas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . A inibição da actividade da enzima induzida pelo alumínio foi mantida após a exposição, pelo que os procedimentos preparativos e os ensaios de actividade podem ter contribuído para subestimar o grau de inibição, *in vivo*, da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  dos ratos expostos a alumínio. A modificação no comportamento cinético da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (a prevenção do efeito estimulatório produzido pela ligação, de baixa afinidade, de ATP e a redução da sensibilidade às concentrações submicromolares de ubaína) é consentânea com a alteração do grau de oligomerização da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada na membrana pré-sináptica, o que pode tornar a enzima insensível à modulação por eventos de sinalização, que medeiam a regulação da sua actividade em condições fisiológicas e patofisiológicas. A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  parece ocorrer num estado inicial da acção neurotóxica do alumínio, porque não foram observadas evidências de morte celular/disrupção da membrana, de diminuição de energia e de alteração do gradiente transmembranar de  $\text{Na}^+$  nos sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral do rato, nem foram observadas correlações entre as alterações da fluidez de membrana, da razão  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  e do balanço prooxidante-antioxidante e o efeito inibitório do alumínio na

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. Deste modo, a inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase parece ser um elemento chave na disfunção cerebral desenvolvida durante a exposição crónica, por via oral, a doses reduzidas de AlCl<sub>3</sub> [ $< 3/100$  da dose letal média ( $DL_{50}$ )].

V – Conclusões



Os resultados obtidos neste trabalho permitiram evidenciar a participação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no mecanismo de acção neurotóxica do alumínio e caracterizar o efeito inibitório do alumínio na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em terminais nervosos isolados (sinaptossomas) a partir do córtex cerebral do rato.

- 1) O cloreto de alumínio, administrado por via oral, é acumulado nos terminais pré-sinápticos do córtex cerebral do rato Wistar macho, jovem e adulto.
  - A administração de 120 mg de  $\text{AlCl}_3/\text{kg}$  de peso corporal aumentou transitoriamente a concentração de alumínio na circulação sistémica, na urina e nas fezes.
  - A administração de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias (0,03 g/dia) provocou um aumento de  $\sim 7$  ng  $\text{Al}^{3+}/\text{mg}$  de proteína na concentração de alumínio nos sinaptossomas.
  - A administração de 10 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 10 dias (1 g/dia) provocou um aumento de  $\sim 5$  ng  $\text{Al}^{3+}/\text{mg}$  de proteína na concentração de alumínio nos sinaptossomas.
  - A exposição a outras fontes de alumínio não modificou a concentração de alumínio nos sinaptossomas isolados a partir dos ratos pertencentes aos grupos de controlo (10,4 e 10,9 ng  $\text{Al}^{3+}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente após 10 e 120 dias).
- 2) A exposição oral e prolongada a cloreto de alumínio [3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias (0,03 g/dia)] permite uma taxa de crescimento normal do rato Wistar macho, jovem e adulto, podendo causar alterações comportamentais.
  - Durante o período experimental, o valor da média do peso corporal aumentou de  $252,0 \pm 9,8$  g para  $377,5 \pm 5,6$  g e de  $246,4 \pm 5,2$  g para  $389,1 \pm 9,0$  g, respectivamente, no grupo de exposição e no grupo de controlo.
  - No teste de evitamento passivo, o valor da latência subsequente de resposta foi superior, enquanto o valor da latência inicial de resposta se manteve inalterado.
  - No teste em campo aberto, não se observaram alterações das actividades exploratórias e locomotoras.
  - Durante o período de exposição, não foram notados episódios convulsivos, tremor ou paralisia, nem alterações na ingestão de água e ração.

- 3) O colesterol pode condicionar a susceptibilidade à intoxicação por alumínio.
- A administração de colestipol (0,31 g/dia) impediu o aumento da concentração de alumínio induzido por administração de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias e diminuiu a razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$  de 0,7 para 0,4 nmol/nmol.
  - A administração de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias induziu a fluidificação da membrana plasmática sináptica, que parece estar mais associada à redução da razão molar  $\text{CH/PL}_{\text{totais}}$ , do que às alterações da composição em fosfolípidos da membrana ou à interacção directa do alumínio com os componentes da membrana carregados negativamente.
- 4) A actividade hidrolítica e de transporte da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal é inibida por  $\text{AlCl}_3$ , de uma maneira dependente da concentração.
- Na presença de concentrações saturantes de Mg-ATP (500  $\mu\text{M}$ ), o  $\text{AlCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  causou uma inibição de 30% da actividade hidrolítica; para concentrações superiores a 75  $\mu\text{M}$  foi verificado um efeito inibitório quase máximo; após incubação com  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  registou-se o efeito inibitório máximo (~60%).
  - O  $\text{AlCl}_3$  reduziu a acumulação de GABA pelos sinaptossomas, que depende do gradiente transmembranar de  $\text{Na}^+$ . A presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  não modificou a inibição (69%) da acumulação de GABA por ubaína 50  $\mu\text{M}$ .
- 5) A exposição oral e prolongada a cloreto de alumínio [3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias (0,03 g/dia)] induziu a inibição das isoenzimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , sem alterar a expressão das isoformas da subunidade catalítica.
- A actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  do cérebro e do rim foi inferior após exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ .
  - Após exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ , a inibição total da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi registada na presença das mesmas concentrações de ubaína ( $1 \times 10^{-3}$  M, fracção sinaptossomal e  $5 \times 10^{-3}$  M, homogeneizados de rim).
  - A análise densitométrica das proteínas imunodetectadas com anticorpos que se ligam a sequências específicas das subunidades  $\alpha_1$  (NASE),  $\alpha_2$  (HERED) e  $\alpha_3$  (TED) demonstrou que se mantiveram inalteradas, após exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$ , as quantidades das proteínas com pesos moleculares relativos de 93 kDa (subunidade  $\alpha_1$ ), 92 kDa (subunidade  $\alpha_2$ ) e 98 kDa (subunidade  $\alpha_3$ ).

- A diminuição total da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi assegurada pela inibição parcial das isoenzimas que contêm as subunidades catalíticas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , tal como revelado pela análise da dependência da actividade enzimática em função da concentração de ubaína.
  - Os procedimentos preparativos e as condições dos ensaios de actividade podem ter contribuído para subestimar o grau de inibição, *in vivo*, da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .
- 6) O alumínio impede a activação adicional da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  produzida pela ligação, de baixa afinidade, de ATP e reduz a sensibilidade da actividade enzimática a concentrações submicromolares de ubaína.
- O alumínio não inibiu a actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na presença de concentrações não saturantes de ATP nem quando o UTP foi utilizado como substrato.
  - O valor de  $n_H$  (coeficiente de Hill da reacção hidrolítica) permaneceu inalterado após a exposição a  $\text{AlCl}_3$ , apresentando valores de 0,7 (condições controlo), 0,8 (exposição *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ ) e 0,8 (exposição *in vivo* a 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses).
  - O efeito inibitório do alumínio requereu a presença de concentrações de ATP superiores a 150  $\mu\text{M}$ .
  - O valor de  $V_{\text{máx}}$  (velocidade máxima) da reacção catalisada pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (281 nmol Pi /min /mg proteína) foi reduzido para, respectivamente, 78 e 154 nmol Pi /min /mg de proteína, durante a exposição *in vitro* a  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  e após exposição *in vivo* a 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 4 meses.
  - A inibição da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por  $\text{AlCl}_3$  na gama de concentrações micromolares foi parcial ( $\leq 60\%$ ) e manteve-se inalterada quando a concentração de  $\text{MgCl}_2$  no meio de reacção foi aumentada de 10 para 60 mM.
  - O valor de  $n$  (número máximo de protómeros que interagem no conjunto oligomérico que constitui a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada na membrana pré-sináptica) diminui de 8 para, respectivamente, 5,5 e 5,4 durante a exposição *in*

*vitro* a  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  e após exposição *in vivo* a 0,03 g/dia de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias.

- A exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  aboliu a inibição da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  do rim por concentrações de ubaína inferiores a  $10^{-6}$  M.
  - A modificação no comportamento cinético da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é consentânea com a alteração do grau de oligomerização da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  integrada na membrana pré-sináptica.
- 7) O alumínio inibe a actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal quando as razões molares  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  e  $\text{PE}/\text{PL}_{\text{totais}}$ , a fluidez de membrana e o balanço prooxidante-antioxidante são alterados.
- O efeito inibitório do alumínio na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  apresentou a mesma característica fundamental (ausência de activação adicional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por concentrações elevadas de ATP) durante a exposição *in vitro* (presença de  $\text{AlCl}_3$  no meio de reacção) e após exposição *in vivo* (administração diária de 0,03 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias).
  - A presença de concentrações micromolares de  $\text{AlCl}_3$  (exposição *in vitro*) diminuiu a fluidez de membrana, de uma maneira dependente de concentração e independente da razão molar  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$ , e reduziu a concentração dos grupos SH, determinada pela reacção colorimétrica com DTNB.
  - A administração de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias (exposição *in vivo*) aumentou a fluidez de membrana, reduziu as razões molares  $\text{CH}/\text{PL}_{\text{totais}}$  e  $\text{PE}/\text{PL}_{\text{totais}}$  e aumentou a exposição dos grupos SH a DTNB.
- 8) A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  parece ocorrer na fase inicial da acção neurotóxica do alumínio.
- A ultra-estrutura dos sinaptossomas manteve-se inalterada após a administração de 3,6 g de  $\text{AlCl}_3$  durante 120 dias (0,03 g/dia).
  - A integridade da membrana pré-sináptica foi conservada durante a exposição oral a  $\text{AlCl}_3$ , não tendo sido observada libertação de LDH, nem alterações nos níveis de nucleótidos de adenina endógenos e na acumulação de GABA pelos sinaptossomas.

- A fracção sinaptossomal isolada a partir do córtex cerebral após a exposição *in vivo* a  $\text{AlCl}_3$  apresentou valores de ATP/ADP e ECP (potencial de carga energética adenínica) idênticos aos registados nas preparações subcelulares obtidas a partir de ratos pertencentes ao grupo controlo.





## VI – Bibliografia

---

- Ackley D. C. & Yokel R. A., 1997. Aluminum citrate is transported from brain into blood via the monocarboxylic acid transporter located at the blood-brain barrier. *Toxicology* 120, 89-97.
- Akeson M. A., Munns D. N. & Burau R. G., 1989. Adsorption of  $\text{Al}^{3+}$  to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 986, 333-340.
- Albrecht J., Simmons M., Dutton G. R. & Norenberg M. D., 1991. Aluminum chloride stimulates the release of endogenous glutamate, taurine and adenosine from cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci. Lett.* 127, 105-107.
- Alessio L., Apostoli P., Ferioli A., Do Sipio I., Mussi I., Rigosa C. & Albertini A., 1989. Behavior of biological indicators of internal dose and some neuro-endocrine tests in aluminium workers. *Med. Lav.* 80, 290-300.
- Alfrey, A. C., Hegg A. & Craswell P., 1980. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Amer. J. Clin. Nutr.* 33, 1509-1516.
- Allain P., Gauchard F. & Krari N., 1996. Enhancement of aluminum digestive absorption by fluoride in rats. *Res. Commun. Mol. Path. Pharmacol.* 91, 225-231.
- Amador F. C., Santos M. S. & Oliveira C. R., 1999. Lipid peroxidation facilitates aluminium accumulation in rat brain synaptosomes. *J. Toxicol. Env. Health* 58, 427-435.
- Andrási E., Farkas E., Scheibler H., Réffy A. & Bezúr L., 1995. Al, Zn, Cu, Mn and Fe levels in brain in Alzheimer's disease. *Arch. Gerontol. Geriat.* 21, 89-97.
- Arystarkhova E. & Sweadner K. J., 1997. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase  $\beta_3$  subunit. The presence of  $\beta_3$  in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 22405-22408.
- Arystarkhova E., Gibbons D. L. & Sweadner K. J., 1995. Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating. *J. Biol. Chem.* 270, 8785-8796.
- Arystarkhova E., Wetzel R., Asinovski N. K. & Sweadner K. J., 1999. The  $\gamma$  subunit modulates  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  affinity of the renal Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 33183-33185.
- Askari A. & Huang W., 1982.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase: evidence for the binding of ATP to the phosphoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 1447-1453.

- Atkinson J., 2001. Cerebrovascular structure and dementia: new drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 630-635.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological Profile for Aluminum. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.
- Atterwill C. K. & Walum E., 1989. Neurotoxicology *in vitro*: Model systems and practical applications. *Toxicol. In Vitro* 3, 159-161.
- Bast-Pettersen R., Skaug V., Elligsen D. & Thomassen Y., 2000. Neurobehavioral performance in aluminium welders. *Am. J. Ind. Med.* 37, 184-192.
- Bazzoni G. B., Bollini A. N., Hernández G. N., Contini M. C., Chiarotto M. M. & Rasia M. L., 2005. In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane. *J. Inorg. Biochem.* 99, 822-827.
- Beauchemin D. & Kisilevsky R., 1998. A method based on ICP-MS for the analysis of Alzheimer's amyloid plaques. *Anal. Chem.* 70, 1026-1029.
- Béguin P., Wang X., Firsov D., Puoti A., Claeys D., Horisberger J. D. & Geering K., 1997. The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16, 4250-4260.
- Bergmeyer H. U. & Bernt E., 1974. UV-assay with pyruvate and NADH. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 574-579.
- Berrebi-Bertrand I., Maixent J. M., Christe G. & Lelievre L. G., 1990. Two active  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 148-156.
- Bertholf R. L., Wills M. R. & Savory J., 1984. Quantitative study of aluminum binding to human serum albumin and transferrin by a chelex competitive binding assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 1020-1024.
- Berthon G., 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord. Chem. Rev.* 228, 319-341.
- Bielarczyk H., Tomaszewicz M. & Szutowicz A., 1998. Effect of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J. Neurochem.* 70, 1175-1181.
- Bilgihan A., Turkozkan N., Aricioglu A., Aykol S., Cevik C. & Goksel M., 1994. The effect of deferoxamine on brain lipid peroxide levels and Na-K ATPase activity following experimental subarachnoid hemorrhage. *Gen. Pharmacol.* 25, 495-497.

- Blanco G. & Mercer R. W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275, F633-F650.
- Blanco G., Berberian G. & Beauge L., 1990. Detection of a highly ouabain sensitive isoform of rat brainstem Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1027, 1-7.
- Blanco G., Koster J. C. & Mercer R. W., 1994. The  $\alpha$  subunit of the Na, K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8542-8546.
- Blanco V. G., 2003-2004. Na,K-ATPase structure. The University of Kansas Medical Center. Molecular and Integrative Physiology. Visit: [www.kumc.edu/physiology/blanco.html](http://www.kumc.edu/physiology/blanco.html)
- Blankenhorn D. H., Nessim S. A., Johnson R. L., Sanmarco M. E., Azen S. P. & Cashin-Hemphill L., 1988. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA* 253, 3233-3240.
- Bloch K., 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19-28.
- Bogdanovic N., Bretillon L., Lund E. G., Diczfalussy U., Lannfelt L., Winblad B., Russell D. W. & Bjorkhem I., 2001. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 314, 45-48.
- Bokovay G., 1988. Aluminium in: Canadian minerals yearbook. Mineral Resources Branch. Department of energy, mines and resources. Ottawa.
- Boldyrev A. & Kurella E., 1996. Mechanism of oxidative damage of dog kidney Na/K-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 483-487.
- Boldyrev A. A. & Bulygina E. R., 1997. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N Y Acad. Sci.* 834, 666-668.
- Boldyrev A. A. & Fedosova N. U., 1990. Comparison of the kinetic properties of membrane-bound and solubilized Na,K-ATPase. *Biochem. Int.* 22, 903-911.
- Boldyrev A. A. & Svinukhova I. A., 1982.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -dependent adenosine triphosphate phosphohydrolase. Two types of kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 167-170.
- Boldyrev A. A., 2001. Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66, 821-831.
- Boldyrev A. A., Bulygina E. R., Kramarenko G. G. & Vanin A. F., 1997. Effect of nitroso compounds on Na/K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1321, 243-251.

- Boldyrev A. A., Fedosova N. U. & Lopina O. D., 1991. The mechanism of the modifying effect of ATP on  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase. *Biomed. Sci.* 2, 450-454.
- Boldyrev A. A., Ruuge E. K. & Scheglova M. V., 1981. Cooperativity of brain Na/K-ATPase. *Biochem. Int.* 2, 137-144.
- Boldyrev A., Song R., Dyatlov V. A., Lawrence D. A. & Carpenter D. O., 2000. Neuronal cell death and reactive oxygen species. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 433-450.
- Bolla K. I., Briefel G., Spector D., Schwartz B. S., Wieler L., Herron J. & Gimenez L., 1992. Neurocognitive effects of aluminium. *Arch. Neurol.* 49, 1021-1026.
- Bondy S. C. & Kirstein S., 1996. The promotion of iron-induced generation of reactive oxygen species in nerve tissue by aluminum. *Molec. Chem. Neuropathol.* 27, 185-194.
- Bondy S. C., Guo-Ross S. X. & Truong A. T., 1998a. Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by  $\beta$ -amyloid. *Brain Res.* 799, 91-96.
- Bondy S. C., Tseng H. & Orvig C., 1998b. Active oxygen species formation in synaptosomes exposed to an aluminum chelator. *Neurotox. Teratol.* 22, 317-320.
- Bores G. M., Smith C. P., Wirtz-Brugger F. & Giovanni A., 1998. Amyloid  $\beta$ -peptides inhibit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: tissue slices versus primary cultures. *Brain Res. Bull.* 46, 423-427.
- Bortnick A. E., Rothblat G. H., Stoudt G., Hoppe K. L., Royer L. J., McNeish J. & Francone O. L., 2000. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J. Biol. Chem.* 275, 28634-28640.
- Braak H. & Braak E., 1991. Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia. *J. Hirnforsch.* 32, 277-282.
- Bradford H. F., 1986. The synaptosome, as in vitro model for the synapse. In *Chemical Neurobiology*. Freeman W. F. and Company, New York, pp. 311-352.
- Bradford H. F., Jones D. G., Ward H. K. & Booher J., 1975. Biochemical and morphological studies of the short and long term survival of isolated nerve-endings.
- Braun J. E. & Madison D. V., 2000. A novel SNAP25-caveolin complex correlates with the onset of persistent synaptic potentiation. *J. Neurosci.* 20, 5997-6006.
- Brotherus J. R., Jacobsen L. & Jorgensen P. L., 1983. Soluble and enzymatically stable  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  from mammalian kidney consisting predominantly of protomer

- alpha beta-units. Preparation, assay and reconstitution of active  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 731, 290-303.
- Brown D. A. & London E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 111-136.
- Brown D. A. & London E., 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221-17224.
- Burwen D. R., Olsen S. M., Bland L. A., Arduino M. J., Reid M. H. & Jarvis W. R., 1995. Epidemic aluminum intoxication in hemodialysis patients traced to use of an aluminum pump. *Kidney Int.* 48, 469-474.
- Calabresi P., De Murtas M., Pisan A., Stefani A., Sancesario G., Mercuri N. B. & Bernardi G., 1995. Vulnerability of medium spiny striatal neurons to glutamate: role of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1674-1683.
- Calderini G., Bonetti A. C., Battistella A., Crews F. T. & Toffano G., 1983. Biochemical changes of rat brain membranes with aging. *Neurochem. Res.* 8, 483-492.
- Campbell A., Hamai D. & Bondy S. C., 2001. Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 22, 63-71.
- Campbell A., Kumar A., La Rosa F. G., Prasad K. N., & Bondy S. C., 2000. Aluminum increases levels of beta-amyloid and ubiquitin in neuroblastoma but not in glioma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 397-402.
- Campbell A., Prasad K. N. & Bondy S. C., 1999. Aluminum-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1166-1171.
- Cannata Andía J. B., 2000. A dynamic bone and chronic renal failure: An overview. *Am. J. Med. Sci.* 320, 81-84.
- Carageorgiou H., Tzotzes V., Pantos C., Mourouzis C., Zarros A. & Tsakiris S., 2004. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase,  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94, 112-118.
- Carvalho C. A. M. & Carvalho A. P., 1979. Effect of temperature and ionophores on the permeability of synaptosomes. *J. Neurochem.* 33, 309-317.

- Cases A., Kelly J., Sabater F., Torres A., Grino M. C., Lopez-Pedret J. & Revert L., 1990. Ocular and auditory toxicity in hemodialyzed patients receiving deferrioxamine. *Nephron*. 56, 19-23.
- Caspers M. L., Dow M. J., Fu M. J., Jacques P. S. & Kwaiser T. M., 1994. Aluminum-induced alterations in [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding and ATP hydrolysis catalyzed by the rat brain synaptosomal ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase. *Mol. Chem. Neuropathol.* 22, 43-55.
- Caspers M. L., Kwaiser T. M. & Grammas P., 1990. Control of [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding to cerebromicrovascular ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase by metal ions and proteins. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1891-1895.
- Caspers M. L., Kwaiser T. M., Dow M. J., Fu M. J. & Grammas P., 1993. Control of the ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase under normal and pathological conditions. *Mol. Chem. Neuropathol.* 19, 65-81.
- Charlemagne D., Orłowski J., Oliviero P., Rannou F., Saint Beuve C., Swynghedauw B. & Lane L. K., 1994. Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat ventricle. *J. Biol. Chem.* 269, 1541-1547.
- Cho S. & Joshi J. G., 1988. Effect of long-term feeding of aluminum chloride on hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the brain. *Toxicology* 48, 61-69.
- Chochina S. V., Avdulov N. A., Igavboa U., Cleary J. P., O'Hare E. O. & Wood W. G., 2001. Amyloid  $\beta$ -peptide $_{1-40}$  increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region. *J. Lipid Res.* 42, 1292-1297.
- Clauberg M. & Joshi J. G., 1993. Regulation of serine protease activity by aluminum: implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 1009-1012.
- Cochran M., Elliott D. C., Brennan P. & Chawtur V., 1990. Inhibition of protein kinase C activation by low concentration of aluminium. *Clin. Chim. Acta* 194, 167-172.
- Coedo A. G., Dorado M. T., Ruiz J. & Escudero M., 1996. Evaluation of flow injection sample to standard addition method for the inductively coupled plasma mass spectrometric determinations of aluminium in biological tissues. *J. Mass Spectrom.* 31, 427-432.
- Collins J. M., Scott R. B., McClish D. K., Taylor J. R. & Grogan W. M., 1991. Altered membrane anisotropy gradients of plasma membranes of living peripheral blood leukocytes in aging and Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 59, 153-162.



- Colomina M. T., Roig J. L., Sanchez D. J. & Domingo J. L., 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23, 775-781.
- Connor D. J., Jope R. S. & Harrell L. E., 1988. Chronic, oral aluminum administration to rats: cognition and cholinergic parameters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 467-474.
- Cornelius F. & Mahmmoud Y. A., 2003. Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins "Fixit". *News Physiol. Sci.* 18, 119-124.
- Cornelius F., 2001. Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry* 40, 8842-8851.
- Cory-Slechta D. A., 1989. Behavioral measures of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 10, 271-295.
- Crapper D. R. & Dalton A. J., 1973a. Aluminum induced neurofibrillary degeneration, brain electrical activity and alterations in acquisition and retention. *Physiol. Behav.* 10, 935-945.
- Crapper D. R. & Dalton A. J., 1973b. Alterations in short-term retention, conditioned avoidance response acquisition and motivation following aluminum induced neurofibrillary degeneration. *Physiol. Behav.* 10, 925-933.
- Crapper D. R., Krishman S. S. & Dalton A. J., 1973. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180, 511-513.
- Cucarella C., Montoliu C., Hermenegildo C., Saez R., Manzo L., Minana M. D. & Felipe V., 1998. Chronic exposure to aluminium impairs neuronal glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway. *J. Neurochem.* 70, 1609-1614.
- Cucchiara B. & Kasner S. E., 2001. Use of statins in CNS disorders. *J. Neurol. Sci.* 187, 81-89.
- Dave K. R., Syal A. R. & Katyare S. S., 2002. Effect of long-term aluminum feeding on kinetics attributes of tissue cholinesterases. *Brain Res. Bull.* 58, 225-233.
- Day J. P., Barker J., Evans L. J. A., Perks J., Seabright P. J., Ackrill P., Lilley J. S., Drumm P. V. & Newton G. W. A., 1991. Aluminium absorption studied by <sup>26</sup>Al tracer. *Lancet* 337, 1345.

- Day J. P., Barker J., King S. J., Miller R. V., Templar J., Lilley J. S., Drumm P. V., Newton G. W. A., Fifield L. K., Stone J. O. H., Allan G. L., Edwardson J. A., Moore P. B., Ferrier I. N., Priest N. D., Newton D., Talbot R. J., Brock J. H., Sanchez L., Dobson C. B., Itzhaki R. F., Radunovic A. & Bradbury M. W. B., 1994. Biological chemistry of aluminium studied using  $^{26}\text{Al}$  and accelerator mass spectrometry. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 92, 463-468.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck M. P., Pierce A., Torpier G. & Cecchelli R., 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 138, 877-889.
- Deleers M., Servais J. P. & Wulfert E., 1985. Micromolar concentrations of  $\text{Al}^{3+}$  induce phase separation, aggregation and dye release in phosphatidylserine-containing lipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 813, 195-200.
- Deloncle R., Guillard O., Huguet F. & Clanet F., 1995. Modification of the blood-brain barrier through chronic intoxication by aluminum glutamate. *Biol. Trace Elem. Res.* 47, 227-233.
- Deng Z., Coudray C., Gouzoux L., Mazur A., Rayssiguier Y. & Pépin D., 2000. Effects of acute and chronic coingestion of  $\text{AlCl}_3$  with citrate or polyphenolic acids on tissue retention and distribution of aluminum in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 75, 245-256.
- Di Paolo N., Masti A., Comparini I. B., Garosi G., Di Paolo M., Centini F., Brardi S., Monaci G. & Finato V., 1997. Uremia, dialysis and aluminium. *Int. J. Artif. Organs* 20, 547-552.
- Dietschy J. M. & Turley S. D., 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105-112.
- Dmitrieva R. I. & Doris P. A., 2003. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 28160-28166.
- Dobrota D., Matejovicova M., Kurella E. G. & Boldyrev A. A., 1999. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19, 141-149.
- Dodd P., Hardy J. A., Darkley A. E. & Strong A. J., 1981. Synaptosomes prepared from fresh human cerebral cortex; morphology, respiration and release of transmitter amino acids. *Brain Res.* 93, 485-489.

- Doelken V., 1897. Über die Wirkung der Aluminium mit besonderer Berücksichtigung der durch das Aluminium verursachten Läsionen im Zentralnervensystem, Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 40, 98-120.
- Domingo J. L., Gomez M., Sanchez D. J., Llobet J. N. & Corbella J., 1993. Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminum from drinking water and diet. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 79, 377-380.
- Domingo J. L., Llorens J., Sanchez D. J., Gomez M., Llobet J. M. & Corbella J., 1996. Age-related effects of aluminum ingestion on brain aluminum accumulation and behaviour in rats. Life Sci. 58, 1387-1395.
- Driscoll C. T. & Schecher W. D., 1988. Aqueous chemistry of aluminium. In: Metal ions in biological systems. Sigel H. & Sigel A. (eds.). Marcel Dekker Inc., New York. 24, 63-64.
- ECETOC, 1992. Evaluation of the neurotoxic potential of chemicals. Brussels, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (Monograph N° 18).
- Ellis D. Z., Rabe J. & Sweadner K. J., 2003. Global loss of Na,K-ATPase and its nitric oxide-mediated regulation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurosci. 23, 43-51.
- Ellman G. L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
- El-Rahman S. S., 2003. Neuropathology of aluminum toxicity in rats (glutamate and GABA impairment). Pharmacol. Res. 47, 189-194.
- Erasmus R. T., Savory J., Wills M. R. & Herman M. M., 1993. Aluminum neurotoxicity in experimental animals. Ther. Drug Monit. 15, 588-592.
- Erecinska M. & Silver I. A., 1989. ATP and brain function. J. Cereb. Blood Flow Metab. 9, 2-19.
- Erecinska M., Nelson D., Yudkoff M. & Silver I. A., 1994a. Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. Biochem. Soc. Trans. 22, 959-966.
- Erecinska M., Nelson D., Yudkoff M. & Silover A., 1994b. Brain bioenergetics. Biochem. Soc. Transactions 22, 959-965.
- Exley C. & Korchazhkina O., 2001. The association of aluminum and  $\beta$  amyloid in Alzheimer's disease. In: Exley C. (Eds.) Aluminium and Alzheimer's disease. The science that describes the link, chapter 22, Elsevier Science, pp. 421-433.

- Exley C., 1999. A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? *J. Inorg. Biochem.* 76, 133-140.
- Exley C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380-387.
- Fagan J. M., Sleczonek B. N. & Sohar I., 1999. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 751-757.
- Fambrough D. M., Lemas M. V., Hamrick M., Emerick M., Renaud K. J., Inman E. M., Hwang B. & Takeyasu K., 1994. Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.* 266, C579-C589.
- Farina M., Lara F. S., Brandão R., Jacques R. & Rocha J. B.T., 2002. Effects of aluminum sulfate on erythropoiesis in rats. *Toxicol. Lett.* 132, 131-139.
- Farkas E., De Vos R. A., Jansen Steur E. N. & Luiten P. G., 2000. Are Alzheimer's disease, hypertension, and cerebrocapillary damage related? *Neurobiol. Aging* 21, 235-243.
- Farooqui A. A. & Horrocks L. A., 2001. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J. Mol. Neurosci.* 16, 263-272.
- Farooqui A. A., Rapoport S. I. & Horrocks L. A., 1997. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem. Res.* 22, 523-527.
- Fasman D., Perczel A. & Moore C. D., 1995. Solubilization of  $\beta$ -amyloid-(1-42)-peptide: reversing the  $\beta$ -sheet conformation induced by aluminum with silicates. *Soc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 369-371.
- Fatemi S. J. A., Kadir F. H. A. & Moore G. R., 1991. Aluminium transport in blood serum. *Biochem. J.* 280, 527-532.
- Felsenfeld D. P. & Sweadner K. J., 1988. Fine specificity mapping and topography of an isozyme-specific epitope of the Na,K-ATPase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 263, 10932-10942.
- Fernandes M. A., Proença M. T., Nogueira A. J., Oliveira L. M., Santiago B., Santana I. & Oliveira C. R., 1999. Effects of apolipoprotein E genotype on blood lipid composition and membrane fluidity in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1454, 89-96.

- Ferrari D., Chiozzi P., Falzoni S., Dal Susino M., Collo G., Buell G. & Di Virgilio F., 1997. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacol.* 36, 1295-1301.
- Fielding C. J., 2001. Caveolae and signaling. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 281-287.
- Flaten T. P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187-196.
- Flaten T. P., Glatte E., Viste A. & Soreide O., 1991. Mortality from dementia among gastroduodenal ulcer patients. *J. Epidemiol. Commun. Health* 45, 203-206.
- Florence A. L., Gauthier A., Ponsar C., Van den Bosch de Aguilar P. & Crichton R. R., 1994. An experimental animal model of aluminium overload. *Neurodegeneration.* 3, 315-323.
- Folch J., Lees M. & Sloane-Stanley G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Foley T. D. & Linnoila M., 1993. Identification of a third isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain synaptosomes. *Life Sci.* 52, 273-278.
- Fritz K. I., Groenendaal F., Andersen C., Ohnishi S. T., Mishra O. P. & Delivoria-Papadopoulos M., 1999. Deleterious brain cell membrane effects after NMDA receptor antagonist administration to newborn piglets. *Brain Res.* 816, 438-45.
- Galbiati F., Volonte D., Gil O., Zanazzi G., Salzer J. L., Sargiacomo M., Scherer P. E., Engelman J. A., Schlegel A., Parenti M., Okamoto T. & Lisanti M. P., 1998. Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 10257-10262.
- Ganrot P. O., 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65, 363-441.
- Garruto R. M., Shankar S. K., Yanagihara R., Salazar A. M., Amyx H. L. & Gajdusek D. C., 1989. Low-calcium, high-aluminum diet-induced motor neuron pathology in cynomolgus monkeys. *Acta Neuropathol.* 78, 210-219.
- Gaw A., Packard C. J., Lindsay G. M., Murray E. F., Griffin B. A., Caslake M. J., Colquhoun I., Wheatley D. J., Lorimer A. R. & Shepherd J., 1996. Effects of

- colestipol alone and in combination with simvastatin on apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 236-249.
- Geering K., 2001. The functional role of  $\beta$ -subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 425-438.
- Geibel S., Kaplan J. H., Bamberg E. & Friedrich T., 2003. Conformational dynamics of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase probed by voltage clamp fluorometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 964-969.
- Gerbi A. & Maixent J. M., 1999. Fatty acid-induced modulation of ouabain responsiveness of rat Na,K-ATPase isoforms. *J. Membr. Biol.* 168, 19-27.
- Gillotte-Taylor K., Nickel M., Johnson W. J., Francone O. L., Holvoet P., Lund-Katz S., Rothblat G. H. & Phillips M. C., 2002. Effects of enrichment of fibroblasts with unesterified cholesterol on the efflux of cellular lipids to apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 277, 11811-11820.
- Glynn A. W., Sparen A., Danielsson L. G., Haeggglund G. & Jorhem L., 1995. Bioavailability of labile aluminium in acidic drinking water: a study in the rat. *Fd. Chem. Toxic.* 33, 403-408.
- Goldberg A. M. & Frazier J. M., 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. *Sci. Am.* 261, 24-30.
- Goldshleger R. & Karlsh S. J., 1999. The energy transduction mechanism of Na,K-ATPase studied with iron-catalyzed oxidative cleavage. *J. Biol. Chem.* 274, 16213-16221.
- Goldstein J. L. & Brown M. S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430.
- Golub M. S. & Domingo J. L., 1996. What we known and what we need to know about developmental aluminum toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 585-597.
- Golub M., Han B., Keen C. L., Gershwin M. E. & Tarara R. P., 1995. Behavioral performance of Swiss webster mice exposed to excess dietary aluminum during development or during development and as adults. *Toxicol. App. Pharmacol.* 133, 64-72.
- Gomez M., Esparza J. L., Nogues M. R., Giralt M., Cabre M. & Domingo J. L., 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 104-111.

- Good P. F., Perl D. P., Bierer L. M. & Schmeidler J., 1992. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann. Neurol.* 31, 286-292.
- Graves A. B., White E., Koepsell T. D., Reifler B. V., van Belle G. & Larson E. B., 1990. The association between aluminum-containing products and Alzheimer's disease. 43, 35-44.
- Greger J. L. & Sutherland J. E. 1997. Aluminum exposure and metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34, 439-474.
- Greger J. L., 1993. Aluminium metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 43-63.
- Greger J. L., Chang M. M. & Macneil G. G., 1994. Tissue turnover of aluminum and GA-67 effect of iron status. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 207, 89-96.
- Gresham L. S., Molgaard C. A., Golbeck A. L. & Smith R., 1986. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. *Neuroepidemiology* 5, 29-38.
- Gribble F. M., Loussouarn G., Tucker S. J., Zhao C., Nichols C. G. & Ashcroft F. M., 2000. A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J. Biol. Chem.* 275, 30046-30049.
- Guan Z., Wang Y., Cairns N. J., Lantos P. L., Dallner G. & Sindelar P. J., 1999. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 740-747.
- Gulya K., Rakonczay Z. & Kasa P., 1990. Cholinotoxic effects of aluminum in rat brain. *J. Neurochem.* 54, 1020-1026.
- Guo G. & Liang Y., 2001. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain Res.* 888, 221-226.
- Gupta A. & Shukla G. S., 1995. Effect of chronic aluminium exposure on the levels of conjugated dienes and enzymatic antioxidants in hippocampus and whole brain of rat. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 716 -722.
- Gupta S. K., Waters D. H. & Gwilt P. R., 1986. Absorption and disposition of aluminum in the rat. *J. Pharm. Sci.* 75, 586-589.
- Gupta V. B., Anitha S., Hegde M. L., Zecca L., Garruto R. M., Ravid R., Shankare S. K., Stein R., Shanmugavelu P. & Rao K. S. J., 2005. Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 143-158.

- Gutteridge J. M. C., Quinlan G. J., Clark I. & Halliwell B., 1985. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochim. Biophys. Acta* 835, 441-447.
- Haines T. H., 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299-324.
- Hajós F., 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.
- Halliwell B., 1991. Reactive oxygen species in living systems. Source, biochemistry and role. *Am. J. Med.* 9, 114-122.
- Hansen O., Jensen J., Noorby J. G. & Ottolenghi P., 1979. A new proposal regarding the subunit composition of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ . *Nature*, 280, 410-412.
- Harder T. & Simons K., 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Hardie D. G. & Hawley S. A., 2001. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23, 1112-1119.
- Harrington C. R., Wischik C. M., McArthur F. K., Taylor G. A., Edwardson J. A. & Candy J. M., 1994. Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet* 343, 993-997.
- Harris W. R., 1992. Equilibrium model for speciation of aluminum in serum. *Clin. Chem.* 38, 1809-1818.
- Harry G. J., Billingsley M., Bruinink A., Campbell I. L., Classen W., Dorman D. C., Galli C., Ray D., Smith R. A. & Tilson H. A., 1998. *In vitro* techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ Health Perspect.* 106, 131-158.
- Hartmann T., 2001. Cholesterol, A $\beta$  and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 24, S45-S48.
- Haug A., Shi B. & Votorello V., 1994. Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* 68, 1-7.
- Hayashi H., Mizuno T., Michikawa M., Haass C. & Yanagisawa K., 2000. Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1483, 81-90.



- Health Canada, Environmental Health Directorate, 1998. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. Supporting Documentation, Part II, Aluminum. pp. 22, Visit: <http://www.hc-sc.gc.ca/waterquality>.
- Huang T. C., Chen C. P., Wefler V. & Raftery A., 1961. A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. Application to a rapid serum cholesterol determination. *Anal. Chem.* 33, 1405-1407.
- Huang W. H., Wang Y., Askari A., Zolotarjova N. & Ganjeizadeh M., 1994. Different sensitivities of the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase isoforms to oxidants. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 108-114.
- Huang Y., Herman M. M., Liu J., Katsetos C. D., Wills M. R. & Savory J., 1997. Neurofibrillary lesions in experimental aluminum-induced encephalopathy and Alzheimer's disease share immunoreactivity for amyloid precursor protein, A $\beta$ ,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin and ubiquitinprotein conjugates. *Brain Res.* 771, 213-220.
- Hussain T., Ali M. M. & Chandra S. V., 1987. The combined effect of Pb<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> on monoamine uptake and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in striatal synaptosomes. *J. Appl. Toxicol.* 7, 277-80.
- Igbavboa U., Avdulov N. A., Schroeder F. & Wood W. G., 1996. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem.* 66, 1717-1725.
- Ikezu T., Trapp B. D., Song K. S., Schlegel A., Lisanti M. P. & Okamoto T., 1998. Caveolae, plasma membrane microdomains for  $\alpha$ -secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 10485-10495.
- Illingworth D. R., Phillipson B. E., Rapp J. H. & Connor W. E., 1981. Colestipol plus nicotinic acid in treatment of heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1, 296-298.
- Inácio A. M., 1993. Todos investigam ninguém assume. A prova fatal. *Diário de Notícias*, 8 de Abril.
- IPCS, 1986. Environmental health criteria 60: Principles and methods for the assessment of neurotoxicity associated with exposure to chemicals. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

- Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J. M. & Nouvelot A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*. 7, 333-337.
- Jansson E. T., 2001. Aluminum exposure and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Disease* 3, 541-549.
- Jewell E. A. & Lingrel J. B., 1991. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\alpha$ 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 266, 16925-16930.
- Jewell E. A., Shamraj O. I. & Lingrel J. B., 1992. Isoforms of the  $\alpha$  subunit of Na,K-ATPase and their significance. *Acta Physiol Scand Suppl.* 607, 161-169.
- Jick H., Zornberg G. L., Jick S. S., Seshadri S. & Drachman D. A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 356, 1627-1631.
- Jing Y., Wang Z. & Song Y., 2004. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synapse* 52, 292-298.
- Johnsen H., Lund S. P., Matikainen E., Midtgard U., Simonsen L. & Wennberg A., 1992. Occupational neurotoxicity: Criteria document for evaluation of existing data. Copenhagen, Nordic Council of Ministers and National Institute of Occupational Health.
- Johnson G. V. W., Cogdill K. W. & Jope R. S., 1990. Oral aluminium alters *in vitro* protein phosphorylation and kinase activities in rat brain. *Neurobiol. Aging* 11, 209-216.
- Johnson V. J., Kim S. H. & Sharma R. P., 2005. Aluminum-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2a cells: potential role for p53 signaling. *Toxicol. Sci.* 83, 329-339.
- Jones D. L. & Kochian L. V., 1997. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Lett.* 400, 51-57.
- Jope R. S. & Johnson G. V., 1992. Neurotoxic effects of dietary aluminium. *Ciba Found Symp.* 169, 254-262.
- Jorgensen P. L. & Pedersen P. A., 2001. Structure-function relationships of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, or Mg<sup>2+</sup> binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 57-74.

- Jorgensen P. L., Hakansson K. O. & Karlsh S. J., 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817-849.
- Joseph J., Shukitt-Hale B., Denisova N. A., Martin A., Perry G. & Smith M. A., 2001. Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 22, 131-146.
- Jouhanneau P., Raisbeck G. M., Yiou F. Lacour B., Banide H. & Drüeke T. B., 1997. Gastrointestinal absorption, tissue retention, and urinary excretion of dietary aluminum in rats determined by using <sup>26</sup>Al. *Clin. Chem.* 43, 1023-1028.
- Julka D. & Gill K. D., 1996. Altered calcium homeostasis: a possible mechanisms of aluminium-induced neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1315, 47-54.
- Julka D., Sandhir R. & Gill K. D., 1995. Altered cholinergic metabolism in rat CNS following aluminium exposure: implications on learning performance. *J. Neurochem.* 65, 2157-2164.
- Julka D., Vasishta R. K. & Gill K. D., 1996. Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 52, 181-192.
- Kaaber K., Nielsen A. O. & Veien N. K., 1992. Vaccination granulomas and aluminium allergy: course and prognostic factors. *Contact Dermatitis*, 26, 304-306.
- Kadoya A., Miyake H. & Ohyashiki T., 2003. Contribution of lipid dynamics on the inhibition of bovine brain synaptosomal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 787-793.
- Kakio A., Nishimoto S. I., Yanagisawa K., Kozutsumi Y. & Matsuzaki K., 2001. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J. Biol. Chem.* 276, 24985-24990.
- Kakko I., Toimela T. & Tahti H., 2003. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere* 51, 475-480.
- Kako K., Kato M., Matsuoka T. & Mustapha A., 1988. Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* 254, C330-C337.

- Kaneko N., Yasui H., Takada J., Suzuki K. & Sakurai H., 2004. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J. Inorg. Biochem.* 98, 2022-2031.
- Kanner B. I. & Schuldiner S., 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *Crit. Rev. Biochem.* 22,1-38.
- Kaplan J. H., 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511-535.
- Kaplan J. H., Lutsenko S., Gatto C., Daoud S. & Kenney L. J., 1997. Ligand-induced conformational changes in the Na,K-ATPase alpha subunit. *Ann. N Y Acad. Sci.* 834, 45-55.
- Katyial R., Desigan B., Sodhi C. P. & Ojha S., 1997. Oral aluminum administration and oxidative injury. *Biol. Trace Elem. Res.* 57, 125-130.
- Kawakami K., Nojima H., Ohta T. & Nagano K., 1986. Molecular cloning and sequence analysis of human Na,K-ATPase  $\beta$ -subunit. *Nucleic Acids Res.* 14, 2833-2844.
- Keenan S. M., DeLisle R. K., Welsh W. J. Paula S. & Ball W. J. Jr., 2005. Elucidation of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase digitalis binding site. *J. Mol. Graph Model* 23, 465-475.
- Kempski O., 2001. Cerebral edema. *Semin. Nephrol.* 21, 303-307.
- Kennedy G. C., 1969. Interactions between feeding behavior and hormones during growth. *Ann. N Y Acad. Sci.* 157, 1049-1061.
- Kent R. B., Fallows D. A., Geissler E., Glaser T., Emanuel J. R., Lalley P. A., Levenson R. & Housman D. E., 1987. Genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Na,K-ATPase are located on three different chromosomes in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5369-5373.
- Kerr D. N. S. & Ward M. K., 1988. In: Metal ions in biological systems. Sigel M. & Sigel A.. Marcel Dekker (eds.). New York. 24, pp. 218-251.
- Kihira T., Yoshida S., Yase Y., Ono S. & Kondo T., 2002. Chronic low-Ca/Mg high-Al diet induces neuronal loss. *Neuropathology.* 22, 171-179.
- Kim J. S., He L. & Lemasters J. J., 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 463-470.
- Kimelberg H. K. & Papahadjopoulos D., 1972. Phospholipid requirements for  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  activity: head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim. Biophys. Acta* 282, 277-292.

- Kimelberg H. K., 1982. Membrane fluidity and membrane activities. In: *Physical Methods in Biological Membranes and their Model System*. NATO advanced study institute series, Plenum Press. 277-290.
- King R. G., Sharp J. A. & Boura A. L. A., 1983. The effect of  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  on human erythrocyte choline transport. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3611-3617.
- Kiss Z., Tomono M. & Anderson W. B., 1994. Phorbol ester selectively stimulates the phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine in multidrug-resistant MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. J.* 302, 649-654.
- Kobayashi M., Kidd D., Hutson E., Grafton J., McNulty S. & Rumsby M., 2001. Protein kinase C activation by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate in CG-4 line oligodendrocytes stimulates turnover of choline and ethanolamine phospholipids by phospholipase D and induces rapid process contraction. *J. Neurochem.* 76, 361-371.
- Koh J. Y. & Choi D. W., 1988. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-Daphorase. *J. Neurosci.* 8, 2153-2163.
- Kong S., Liochev S. & Fridovich I., 1992. Aluminum(III) facilitates the oxidation of NADH by the superoxide anion. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 79-81.
- Koster J. C., Blanco G. & Mercer R. W., 1995. A cytoplasmic region of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit is necessary for specific  $\alpha/\alpha$  association. *J. Biol. Chem.* 270, 14332-14339.
- Kourie J. I., 2001. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems: implications for neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21, 173-213.
- Krnjevic K., 1970. Glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain. *Nature.* 228, 119-24.
- Kuhry J. G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C. & Laustriat G., 1983. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys.* 5, 129-140.
- Kumar S., 1998. Biphasic effect of aluminium on cholinergic enzyme of rat brain. *Neurosci. Letters* 248, 121-123.
- Kuo Y. M., Emmerling M. R., Bisgaier C. L., Essenburg A. D., Lampert H. C., Drumm D. & Roher A. E., 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 711-715.

- Kurella E. G., Osipov A. N., Goldman R., Boldyrev A. A. & Kagan V. E., 1995. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by phenoxyl radicals of etoposide (VP-16): role of sulfhydryls oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1232, 52-58.
- Kurella E. G., Tyulina O. V. & Boldyrev A. A., 1999. Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19, 133-140.
- Kurella E., Kukley M., Tyulina O., Dobrota D., Matejovicova M., Mezesova V. & Boldyrev A., 1997. Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834, 661-665.
- Kuroda Y., Kobayashi K., Ichikawa M., Kawahara M. & Muramoto K., 1995. Application of long-term cultured neurons in aging and neurological research: aluminum neurotoxicity, synaptic degeneration and Alzheimer's disease. *Gerontology* 41, 2-6.
- Ladefoged O., Lam H. R., Ostergaard G. & Nielsen E., 1995. Neurotoxicology: Review of definitions, methodology and criteria. Copenhagen, National Food Agency of Denmark and Danish Environmental Protection Agency (Miljøprojekt nr. 282).
- Lai J. C. K. & Blass J. P., 1984. Inhibition of brain glycolysis by aluminum. *J. Neurochem.* 42, 438-446.
- Lai J. C. K., Guest J. F., Leung T. K. C., Lim L. & Davison A. N., 1980a. The effects of cadmium, manganese and aluminium on sodium-potassium-activated and magnesium-activated adenosine triphosphatase activity and choline uptake in rat brain synaptosomes. *Biochem. Pharmacol.* 26, 141-146.
- Lai J. C., Guest J. F., Leung T. K., Lim L. & Davison A. N., 1980b. The monoamine oxidase inhibitors clorgyline and L-deprenyl also affect the uptake of dopamine, noradrenaline and serotonin by rat brain synaptosomal preparations. *Biochem. Pharmacol.* 29, 141-146.
- Lai J. C., Guest J. F., Lim L. & Davison A. N., 1978. The effects of transition-metal ions on rat brain synaptosomal amine-uptake systems. *Biochem. Soc. Trans.* 6, 1010-1012.
- Lai J. C., Lim L. & Davison A. N., 1982. Effects of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Al}^{3+}$  on rat brain synaptosomal uptake of noradrenaline and serotonin. *J. Inorg. Biochem.* 17, 215-225.
- Lal B., Gupta A., Murthy R. C., Ali M. M. & Chandra S. V., 1993. Aluminum ingestion alters behaviour and some neurochemicals in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 31, 30-35.

- Lauderback C. M., Harris-White M. E., Wang Y., Pedigo N. W. Jr, Carney J. M. & Butterfield D. A., 1999. Amyloid  $\beta$ -peptide inhibits  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate uptake. *Life Sci.* 65, 1977-1981.
- Laughery M., Todd M. & Kaplan J. H., 2004. Oligomerization of the Na,K-ATPase in cell membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 36339-36348.
- Layne E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* 3, 447-451.
- LaZerte B. D., van Loon G. & Anderson B., 1997. Aluminum in water. In: Research issues in aluminum toxicity. Eds.: Yokel R. A. & Golub M. S.. Taylor and Francis, Washington, D. C., USA, 1997, pp. 17-45.
- Lees G. J. & Leong W., 1994. Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium-potassium ATPase. *Brain Res.* 649, 225-233.
- Lees G. J., 1991. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 16, 283-300.
- Lehotský J., Kaplán P., Racay P., Matejovicová M., Drgová A. & Mezesová V., 1999. Membrane ion transport systems during oxidative stress in rodent brain: protective effect of stobadine and other antioxidants. *Life Sci.* 65, 1951-1958.
- Leray C. & Pelletier X., 1987. Thin-layer chromatography of human platelet phospholipids with fatty acid analysis. *J. Chromatogr.* 420, 411-416.
- Lévesque L., Mizzen C. A., McLachlan D. R. & Fraser P. E., 2000. Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. *Brain Res.* 877, 191-202.
- Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amiei A., Climent I., Lenz A. G., Ahn B. W., Shalhtiel S. & Stadtman E. R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Lijnen P., Celis H., Fagard R., Staessen J. & Amery A., 1994. Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport systems. *J Hypertens.* 12, 59-64.
- Lingrel J. B. & Kuntzweiler T., 1994.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 269, 19659-19662.

- Lingrel J. B., Orlowski J., Shull M. M. & Price E. M. 1990. Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38, 37-89.
- Lione A., 1985. Aluminum toxicology and the aluminum - containing medications. *Pharm. Ther.* 29, 255-285.
- Lipman J. J. & Tolchard S., 1989. Comparison of the effects of central and peripheral aluminum administration on regional 2-deoxy-D-glucose incorporation in the rat brain. *Life Sci.* 45, 1977-1987.
- Lipman J. J., Colowick S. P., Lawrence P. L. & Abumrad N. N., 1988. Aluminum induced encephalopathy in the rat. *Life Sci.* 42, 863-875.
- Lopez L. B., Quintas L. E. & Noel F., 2002. Influence of development on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 323-333.
- Lopina O. D., 2000.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membr. Cell Biol.* 13, 721-744.
- Lopina O. D., 2001. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry* 66, 1122-1131.
- Lopina O. D., Sarvazyan N. A., Askari A., Boldyrev A. A., 1995. A comparative study of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases of duck salt gland and canine kidney: implications for the enzyme's reaction mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 429-433.
- Lovell M. A., Xie C. & Markesbery W. R., 1999. Protection against amyloid beta peptide toxicity by zinc. *Brain Res.* 823, 88-95.
- Lukiw W. J., LeBlanc H. J., Carver L. A., McLachlan D. R. & Bazan N. G., 1998. Run-on gene transcription in human neocortical nuclei. Inhibition by nanomolar aluminum and implications for neurodegenerative disease. *J. Mol. Neurosci.* 11, 67-78.
- Lukoyanov N. V. & Andrade J. P., 2000. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research* 112, 85-97.
- Luo J., Yin J., Wu H. & Wei Q., 2003. Extract from fructus cannabis activating calcineurin improved learning and memory in mice with chemical drug-induced dysmnnesia. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 1137-1142.



- Lynch C. & Mobley W., 2000. Comprehensive theory of Alzheimer's disease. The effects of cholesterol on membrane receptor trafficking. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 924, 104-111.
- MacPhail R. C., Peele D. B. & Crofton K. M., 1989. Motor activity and screening for neurotoxicity. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8, 117-125.
- MacTutus C. F., Unger K. L. & Tilson H. A., 1982. Neonatal chlordecone exposure impairs early learning and memory in the rat on a multiple measure passive avoidance task. *Neurotoxicology.* 3, 27-44.
- Madesh M. & Balasubramanian K. A., 1997. Metal ion stimulation of phospholipase D-like activity of isolated rat intestinal mitochondria. *Lipids.* 32, 471-479.
- Malavolti M., Fromm H., Ceryak S. & Shehan K. L., 1991. Cerebral low-density lipoprotein (LDL) uptake is stimulated by acute bile drainage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1081, 106-108.
- Malik N., Canfield V. A., Beckers M. C., Gros P. & Levenson R., 1996. Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 22754-22758.
- Mann C. L., Bortner C. D., Jewell C. M. & Cidlowski J. A., 2001. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. *Endocrinology* 142, 5059-5068.
- Mark R. J., Hensley K., Butterfield D. A. & Mattson M. P., 1995. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. *J. Neurosci.* 15, 6239-6249.
- Mark R. J., Lovell M. A., Markesbery W. R., Uchida K. & Mattson M. P., 1997. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem.* 68, 255-64.
- Marquis J. K. & Black E. E., 1984. Aluminum activation and inactivation of bovine caudate acetylcholinesterase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 704-710.
- Martin D. W., Marecek J., Scarlata S. & Sachs J. R., 2000.  $\alpha\beta$  protomers of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: formation of higher oligomers does not modify molecular activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 3195-3200.

- Martin R. B., 1986. The chemistry of aluminium as related to biology and medicine. *Clin. Chem.* 32, 1797-1806.
- Martin-Vasallo P., Dackowski W., Emanuel J. R. & Levenson R., 1989. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase  $\beta$  subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264, 4613-4618.
- Masserini M., Palestini P. & Pitto M., 1999. Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J. Neurochem.* 73, 1-11.
- Maunsbach A. B., Skriver E. & Hebert H., 1991. Two-dimensional crystals and three-dimensional structure of Na,K-ATPase analyzed by electron microscopy. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 46, 159-172.
- McCarthy J. T., Milliner D. S. & Johnson W. J., 1990. Clinical experience with desferrioxamine in dialysis patients with aluminium toxicity. *Q. J. Med.* 74, 257-276.
- McDermott J. R., Smith A. I., Iqbal K. & Wisnieswsk H. M., 1979. Brain aluminium in aging and Alzheimer disease. *Neurology* 29, 809-814.
- McDermott J. R., Smith A. I., Ward M. K., Parkinson I. S. & Kerr D. N., 1978. Brain-aluminium concentration in dialysis encephalopathy. *Lancet* 1, 901-904.
- McDonough A. A., Geering K. & Farley R. A., 1990. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* 4, 1598-1605.
- McLachlan D. R. C., 1995. Aluminium and the risk for Alzheimer's disease. *Environmetrics* 6, 233-275.
- McLachlan D. R. C., Dalton A. J., Kruck T. P. A., Bell M. Y., Smith W. L., Kalow W. & Andrews D. F., 1991a. Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 337, 1304-1308.
- McLachlan D. R. C., Kruck T. P., Lukiw W. J. & Krishnan S. S., 1991b. Would decreased aluminium ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease? *Can. Med. Assoc. J.* 145, 793-804.
- Meiri H., Banin E., Roll M. & Rosseau A., 1993. Toxic effects of aluminium on nerve cells and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 40, 89-121.
- Mercer R. W., Biemesderfer D., Bliss D. P. Jr, Collins J. H. & Forbush B. 3rd., 1993. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 121, 579-586.

- Miller R. G., Kopfler F. C., Kelty K. C., Stober J. A. & Ulmer N. S., 1984. The occurrence of aluminum in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 76, 84-91.
- Mimura K., Matsui H., Takagi T. & Hayashi Y., 1993. Change in oligomeric structure of solubilized  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase induced by octaethyleneglycoldodecylether, phosphatidylserine and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 1145, 63-74.
- Miu A. C., Andreescu C. E., Vasiu R. & Olteanu A. I., 2003. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int. J. Neurosci.* 113, 1197-1211.
- Miu A. C., Olteanu A. I. & Miclea M., 2004. A behavioral and ultrastructural dissection of the interference of aluminum with aging. *J. Alzheimers Dis.* 6, 315-328.
- Mizuno T., Nakata M., Naiki H., Michikawa M., Wang R., Haass C. & Yanagisawa K., 1999. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274, 15110-15114.
- Mjöberg B., Helquist E., Mallmin H. & Lindh U., 1997. Aluminium, Alzheimer's disease and bone fragility. *Acta Orthop. Scand.* 68, 511-514.
- Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M. D., Trevan M., Francis M. J., Lamb J. F. & Martin-Vasallo P., 2000.  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51-91.
- Mobasher A., Errington R. J., Golding S., Hall A. C. & Urban J. P., 1997b. Characterization of the  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase in isolated bovine articular chondrocytes; molecular evidence for multiple  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms. *Cell Biol. Int.* 21, 201-212.
- Mobasher A., Errington R. J., Golding S., Hall A. C. & Urban J. P., 1996. Characterization of the  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase in isolated bovine articular chondrocytes; molecular evidence for multiple  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms. *Cell Biol. Int.* 21, 201-212.
- Mobasher A., Hall A. C., Urban J. P., France S. J. & Smith A. L., 1997a. Immunologic and autoradiographic localisation of the  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase in articular cartilage: upregulation in response to changes in extracellular  $\text{Na}^+$  concentration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 649-657.
- Moesgaard B., Petersen G., Jaroszewski J. W. & Hansen H. S., 2000. Age dependent accumulation of *N*-acyl-ethanolamine phospholipids in ischemic rat brain. A  $^{31}\text{P}$  NMR and enzyme activity study. *J. Lipid Res.* 41, 985-990.

- Mohraz M., Arystarkhova E. & Sweadner K. J., 1994. Immunoelectron microscopy of epitopes on Na,K-ATPase catalytic subunit. Implications for the transmembrane organization of the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269, 2929-2936.
- Mori T., Paris D., Town T., Rojiani A. M., Sparks D. L., Delledonne A., Crawford F., Abdullah L. I., Humphrey J. A., Dickson D. W. & Mullan M. J., 2001. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP<sub>SW</sub> mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 778-785.
- Mukherjee J. J., Chung T., Ways D. K. & Kiss Z., 1996. Protein kinase C $\alpha$  is a major mediator of the stimulatory effect of phorbol ester on phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28912-28917.
- Muller W. E., Eckert G. P., Scheuer K., Cairns N. J., Maras A. & Gattazs W. F., 1998. Effects of  $\beta$ -amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 1-43. *Amyloid* 5, 10-15.
- Nagyvary J. & Bradbury E. L., 1977. Hypocholesterolemic effect of Al<sup>3+</sup> complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 592-598.
- Nakamura H., Rose P. G., Blumer J. L. & Reed M. D., 2000. Acute encephalopathy due to aluminum toxicity successfully treated by combined intravenous deferoxamine and hemodialysis. *J. Clin. Pharmacol.* 40, 296-300.
- Nayak P. & Chatterjee A. K., 1999. Biochemical view of aluminum-induced neurohazards. *J. Environ. Biol.* 20, 77-84.
- Nayak P. & Chatterjee A. K., 2001. Effects of aluminum exposure on brain glutamate and GABA systems : an experimental study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1285-1289.
- Nayak P. & Chatterjee A. K., 2003. Dietary protein restriction causes modification in aluminum-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. *BMC Neuroscience* 4, 4.
- Neiva T. J. C., Benedetti A. L., Tanaka S. M. C. N., Santos J. I. & D'Amico E. A., 2002. Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 345-350.
- Nemecz G., Fontaine R. N. & Schroeder F., 1988. A fluorescence and radiolabel study of sterol exchange between membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 943, 511-521.
- Nicholls D. G. & Budd S. L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 80, 315-360.

- Nicholls D. G., 1989. Release of glutamate, aspartate, and  $\gamma$ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52, 331-341.
- Nichols B. J. & Lippincott-Schwartz J., 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11, 406-412.
- Nostrandt A. C., Shafer T. J., Mundy W. R. & Padilla S., 1996. Inhibition of rat brain phosphatidylinositol-specific phospholipase C by aluminum: regional differences, interactions with aluminum salts, and mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 118-125.
- Notkola I. L., Sulkava R., Pekkanen J., Erkinjuntti T., Ehnholm C., Kivinen P., Tuomilehto J. & Nissinen A., 1998. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology.* 17, 14-20.
- O'Brien, W. J., Lingrel J. B. & Wallick E. T., 1994. Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 32-39.
- O'Donoghue J. L., 1994. Defining what is neurotoxic. In: Weiss B & O'Donoghue J. L. ed. *Neurobehavioural toxicity: Analysis and interpretation.* New York, Raven Press, pp 19-33.
- Ogino C., Negi Y., Matsumiya T., Nakaoka K., Kondo A., Kuroda S., Tokuyama S., Kikkawa U., Yamane T. & Fukuda H., 1999. Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptovercillium cinnamomeum*. *J. Biochem.* 125, 263-269.
- Ohba S., Hiramatsu M., Edamatsu R., Mori I. & Mori A., 1994. Metal ions affect neuronal membrane fluidity of rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 19, 237-241.
- Ohyashiki T., Karino T., Suzuki S. & Matsuri K., 1996. Effect of aluminium ion on  $\text{Fe}^{2+}$ -induced peroxidation in phospholipid liposomes under acidic condition. *J. Biochem.* 120, 895-900.
- Ohyashiki T., Satoh E., Okada M., Takadera T. & Sahara M., 2002. Nerve growth factor protects against aluminum-mediated cell death. *Toxicology* 176, 195-207.
- Ohyashiki T., Suzuki S., Sato E. & Uemori Y., 1998. A marked stimulation of  $\text{Fe}^{2+}$ -initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminium complex, aluminium acetylacetonate. *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 141-149.

- Oteiza P. I., 1994. A mechanism for the stimulatory effect of aluminium on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 374-379.
- Oteiza P. I., Fraga C. G. & Keen C. L., 1993. Aluminum has both oxidant and antioxidant effects in mouse brain membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 517-521.
- Oteiza P. I., Mackenzie G. G. & Verstraeten S. V., 2004. Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcription factors. *Molec. Aspects Med.* 25, 103-115.
- Oyanagi K., 2005. The nature of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam and magnesium deficiency. *Parkinsonism Relat. Disord.* 11, S17-S23.
- Pal R., Nath R. & Gill K. D., 1993. Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase and acetylcholinesterase in various regions of adult rat brain. *Neurochem Int.* 23, 451-8.
- Panchalingam K., Sachedina S., Pettegrew J. W. & Glonek T., 1991. Al-ATP as an intracellular carrier of Al(III) ion. *Int. J. Biochem.* 23, 1453-1469.
- Pandya J. D., Dave K. R. & Katyare S. S., 2001. Effect of long-term aluminum feeding on lipid/phospholipid profiles of rat brain synaptic plasma membranes and microsomes. *J. Alzheimer's Dis.* 3, 531-539.
- Parle M. & Dhingra D., 2003. Ascorbic acid: a promising memory-enhancer in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 129-135.
- Pathak B. G., Neumann J. C., Croyle M. L. & Lingrel J. B., 1994. The presence of both negative and positive elements in the 5'-flanking sequence of the rat Na,K-ATPase  $\alpha 3$  subunit gene are required for brain expression in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4748-4755.
- Pawels P. J., Van Assouw H. P., Leysen J. E. & Janssen P. A. J., 1989.  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated neuronal death in rat brain neuronal cultures by veratridine: protection by flunarizine. *Mol. Pharmacol.* 36, 525-531.
- Pendlebury W. W. & Perl D. P., 1988. Aluminum-induced neurofibrillary degeneration disrupts acquisition of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behav. Neurosci.* 102, 615-620.

- Peng J. H., Xu Z. C., Parker J. C., Friedlander E. R., Tang J. P. & Melethil S., 1992. Aluminum-induced acute cholinergic neurotoxicity in rat. *Mol. Chem. Neuropathol.* 17, 79-89.
- Peng L., Martin-Vasallo P. & Sweadner K. J., 1997. Isoforms of Na,K-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.* 17, 3488-3502.
- Pennington J. A. T., 1987. Aluminium content of foods and diets. *Fd. Addit. Contam.* 5, 161-232.
- Perl D. P., Gajdusek D. C., Garruto R. M., Yanagihara R. T. & Gibbs C. J., 1982. Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia of Guam. *Science* 217, 1053-1055.
- Petit T. L., Biederman G. B. & McMullen P.A., 1980. Neurofibrillary degeneration, dendritic dying back, and learning-memory deficits after aluminum administration: implications for brain aging. *Exp. Neurol.* 67, 152-162.
- Petit T. L., Biederman G. B., Jonas P. & LeBoutillier J. C., 1985. Neurobehavioral development following aluminum administration in infant rabbits. *Exp. Neurol.* 88: 640-651.
- Pettitt T. R., McDermott M., Saqib K. M., Shimwell N. & Wakelam M. J., 2001. Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. *Biochem. J.* 360, 707-715.
- Pina-Chable M. L. & Hernandez-Sotomayor S. M., 2001. Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Prostaglandins* 65, 45-56.
- Plesner I. W., Plesner L., Norby J. G. & Klodos I., 1981. The steady-state kinetic mechanism of ATP hydrolysis catalyzed by membrane-bound ( $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ )-ATPase from ox brain. III. A minimal model. *Biochim. Biophys. Acta* 643, 483-494.
- Pressley T. A., 1992. Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within  $\alpha$ -subunit of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. *J. Physiol.* 262, C743-C751.
- Priest N. D., 1994. A human volunteer feeding study using aluminium-26 labelled aluminium citrate, aluminium hydroxide and aluminium hydroxide in the presence of citrate. Harwell, Oxfordshire, AEA Technology (Report N° AEA-TPD-268).
- Rabe A., Lee M. H., Shek J. & Wisniewski H. M., 1982. Learning deficit in immature rabbits with aluminum-induced neurofibrillary changes. *Exp. Neurol.* 76, 441-446.

- Rabini R. A., Vignini A., Martarelli D., Nanetti L., Salvolini E., Rizzo M. R., Ragno E., Paolisso G., Franceschi C. & Mazzanti L., 2003. Evidence for reduction of pro-atherosclerotic properties in platelets from healthy centenarians. *Exp. Gerontol.* 38, 367-371.
- Rajasekaran K., 2000. Effects of combined exposure to aluminium and ethanol on food intake, motor behaviour and a few biochemical parameters in pubertal rats. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 9, 25-30.
- Rajasekaran N. S., Devaraj N. S. & Devaraj H., 2004. Modulation of rat erythrocyte antioxidant defense system by buthionine sulfoximine and its reversal by glutathione monoester therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1688, 121-129.
- Rao A. M., Igavboa U., Semotuk M., Schroeder F. & Wood W. G., 1993. Kinetics and size of cholesterol lateral domains in synaptosomal membranes: modification by sphingomyelinase and effects on membrane enzyme activity. *Neurochem. Int.* 23, 45-52.
- Rao K. S., 1990. Effects of aluminium salts on synaptosomal enzymes--an in vitro kinetic study. *Biochem. Int.* 22, 725-734.
- Rao K. S., 1992. Effect of aluminium (Al) on the brain cells of the rat. *Biochem. Int.* 28, 51-56.
- Rauchová H., Drahotka Z. & Koudelova J., 1999. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. *Physiol. Res.* 48, 73-78.
- Refolo L. M., Malester B., LaFrancois J., Bryant-Thomas T., Wang R., Tint G. S., Sambamurti K., Duff K. & Pappolla M. A., 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 7, 321-331.
- Rego A. C. & Oliveira C. R., 1995. Dual effect of lipid peroxidation on the membrane order of retinal cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 127-136.
- Repke K. R. & Schoen R., 1973. Flip-flop model of (Na/K)-ATPase function. *Acta Biol. Med. Ger.* 31, K19-K30.
- Riddell D. R., Christie G., Hussain I. & Dingwall C., 2001. Compartmentalization of  $\beta$ -secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* 11, 1288-1293.



- Rob P. M., Niederstadt C. & Reusche E., 2001. Dementia in patients undergoing long-term dialysis: aetiology, differential diagnoses, epidemiology and management. *CNS Drugs*. 15, 691-699.
- Roberts N. B., Clough A., Bellia J. P. & Kim J. Y., 1998. Increased absorption of aluminium from a normal dietary intake in dementia. *J. Inorg. Biochem.* 69, 171-176.
- Rodger R. S. C., Muralikrishna G. S., Halls D. J. Henderson J. B., Forrest J. A., Macdougall A. I. & Fell G. S., 1991. Ranitidine suppresses aluminum absorption in man. *Clin. Sci.* 88, 505-508.
- Rondeau V., 2002. A review of epidemiologic studies on aluminum and silica in relation to Alzheimer's disease and associated disorders. *Rev. Environ. Health* 17, 107-121.
- Rosenkrantz T. S., Kubin J., Mishra O. P., Smith D. & Delivoria-Papadopoulos M., 1996. Brain cell membrane ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase activity following severe hypoxic injury in the newborn piglet. *Brain Res.* 730, 52-57.
- Ross S. T. & Soltesz I., 2000. Selective depolarization of interneurons in the early posttraumatic dentate gyrus: involvement of the  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$ -ATPase. *J. Neurophysiol.* 83, 2916-2930.
- Russell R. W., 1991. Essential roles for animal models in understanding human toxicities. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 7-11.
- Russo J. J. & Sweadner K. J., 1993.  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase subunit isoform pattern modification by mitogenic insulin concentration in 3T3-L1 preadipocytes. *Am. J. Physiol.* 264, C311-C316.
- Sakai S., Tasaka J. & Tosaka T., 1990. Sodium dependency of GABA uptake into glial cells in bullfrog sympathetic ganglia. *Neurochem Res.* 15, 843-847.
- Salema R. & Santos I., 1992. In: *Microscopia electrónica de transmissão. Instrumentação e técnicas para material biológico*. Instituto Nacional de Investigação Científica. Lisboa. 133-145.
- Santos M. S., Goncalves P. P. & Carvalho A. P., 1990. Effect of ouabain on the  $\gamma$ - $^3\text{H}$ aminobutyric acid uptake and release in the absence of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{K}^+$ -depolarization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 620-7.
- Santos M. S., Moreno A. J. & Carvalho A. P., 1996. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. *An*

- in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* 27, 941-950.
- Sarin S., Gupta V. & Gill K. D., 1997a. Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biol. Trace Elem. Res.* 59, 133-143.
- Sarin S., Julka D. & Gill K. D., 1997b. Regional alterations in calcium homeostasis in the primate brain following chronic aluminium exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 168, 95-100.
- Sarkarati B., Cokugras A. N. & Tezcan E. F., 1999. Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ : Comparison of the effects of metal ions on cholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol. C122*, 181-190.
- Sarvazyan N. A., Modyanov N. N. & Askari A., 1995. Intersubunit and intrasubunit contact regions of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase revealed by controlled proteolysis and chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* 270, 26528-26532.
- Savory J., Exley C., Forbes W. F., Huang Y., Joshi J. G., Kruck T., McLachlan D. R. C. & Wakayama I., 1996. Can the controversy of the role of aluminum in Alzheimer's disease be resolved? What are the suggested approaches to this controversy and methodological issues to be considered? *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 615-635.
- Savory J., Herman M. M. & Ghribi O., 2003. Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J. Inorg. Biochem.* 97, 151-154.
- Savory J., Huang Y., Wills M. R. & Herman M. M., 1998. Reversal by desferrioxamine of tau protein aggregates following two days of treatment in aluminum-induced neurofibrillary degeneration in rabbit: implications for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 19, 209-214.
- Savory J., Rao J. K. S., Huang Y., Letada P. R. & Herman M. M., 1999. Age-related hippocampal changes in Bcl-2: Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration: Increased susceptibility with aging. *Neurotoxicology* 20, 805-817.
- Scheiner-Bobis G., 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics. *Eur. J. Biochem.* 269, 2424-2433.

- Schroeder F., Jefferson J. R., Kier A. B., Scallen T. J. Wood W. G. & Hapala I., 1991. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196, 235-252.
- Schroeder F., Woodford J. K., Kavecansky J., Wood W. G. & Joiner C., 1995. Cholesterol domains in biological membranes. *Mol. Membr. Biol.* 12, 113-119.
- Scott I. D. & Nicholls D. G., 1980. Energy transduction in intact synaptosomes. *Biochem. J.* 186, 21-23.
- Serluca F. C., Sidow A., Mably J. D. & Fishman M. C., 2001. Partitioning of tissue expression accompanies multiple duplications of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha subunit gene. *Genome Res.* 11, 1625-1631.
- Shacter E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32, 307-326.
- Shafer T. J. & Mundy W. R., 1995. Effects of aluminium on neuronal signal transduction: mechanisms underlying disruption of phosphoinositide hydrolysis. *Gen. Pharmac.* 26, 889-895.
- Shainskaya A. & Karlish S. J. D., 1994. Evidence that the cation occlusion domain of Na/K-ATPase consists of a complex of membrane-spanning segments. Analysis of limit membrane-embedded tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 269, 10780-10789.
- Shamraj O. I. & Lingrel J. B., 1994. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit gene in expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12952-12956.
- Sharp T. R. & Rosemberry T. L., 1985. Ionic streng the dependence of the inhibition of acetylcholinesterase activity by Al<sup>3+</sup>. *Biophys. Chem.* 21, 261-264.
- Shaughnessy L. W., Barone S. Jr., Mundy W. R., Herr D. W. & Tilson H. A., 1994. Comparison of intracranial infusions of colchicine and ibotenic acid as models of neurodegeneration in the basal forebrain. *Brain Res.* 637, 15-26.
- Shinitzky M. & Barenholtz Y., 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochem. Biophys. Acta* 515, 367-394.
- Shinitzky M., 1984. Membrane fluidity and cellular functions. In: *Physiology of membrane fluidity*. Shinitzky M. ed, 1, 1-51.

- Shouffani A. & Kanner B. I., 1990. Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265, 6002-6008.
- Shull G. E., Greeb J. & Lingrel J. B., 1986. Molecular cloning of three distinct forms of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit from rat brain. *Biochemistry* 25, 8125-8132.
- Shull M. M. & Lingrel J. B., 1987. Multiple genes encode the human  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase catalytic subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 4039-4043.
- Shyjan A. W. & Levenson R., 1989. Antisera specific for the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , and  $\beta$  subunits of the Na,K-ATPase: differential expression of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry* 28, 4531-4535.
- Siems W. G., Hapner S. J., van Kuijk F. J., 1996. 4-hydroxynonenal inhibits  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 215-223.
- Silvius J. R. & McElhaney R. N., 1982. Membrane fluidity and physical state and the activity of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of *Acholeplasma Laidlawii*. *B. Biophys. J.* 37, 36-38.
- Simons K. & Ikonen E., 2000. How cells handle cholesterol. *Science*. 290, 1721-1726.
- Simons K. & Toomre D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Simons M., Keller P., Dichgans J. & Schulz J. B., 2001. Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology*. 57, 1089-1093.
- Simpson J. & Smart L., 1982. Sodium-dependent choline binding in rat hippocampal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 80, 267-270.
- Sinensky M., Pnkerton F., Sutherland E. & Simon F. R., 1979. Rate limitation of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated adenosinetriphosphatase by membrane acyl chain ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4893-4897.
- Skou J. C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401.
- Skou J. C., 1965. Enzymatic basis for active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45, 596-617.
- Skou J. C., 1989. The identification of the sodium-pump as the membrane-bound  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: a commentary. *Biochim. Biophys. Acta* 1000, 435-438.

- Skou J. C., 1990. The energy coupled exchange of  $\text{Na}^+$  for  $\text{K}^+$  across the cell membrane. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -pump. *Febs Lett.* 268, 314-324.
- Skriver E., Maunsbach A. B., Hebert H., Scheiner-Bobis G. & Schoner W., 1989. Two-dimensional crystalline arrays of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase with new subunit interactions induced by cobalt-tetrammine-ATP. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 102, 189-195.
- Smith C. C., Hyatt P. J., Stanyer L. & Betteridge D. J., 2001. Platelet secretion of  $\beta$ -amyloid is increased in hypercholesterolaemia. *Brain Res.* 896, 161-164.
- Soares J. C. & Gershon S., 1994. Studies of aluminum neurobehavioral toxicity in the intact mammal. *Cell Molec. Neurobiol.* 14, 791-808.
- Sollars C. J., Bragg S., Simpson A. M. & Perry R., 1989. Aluminium in European drinking water. *Environ. Technol. Lett.* 10, 131-150.
- Sparks D. L., Liu H., Gross D. R. & Scheff S. W., 1995. Increased density of cortical apolipoprotein E immunoreactive neurons in rabbit brain after dietary administration of cholesterol. *Neurosci. Lett.* 187, 142-144.
- Sparks D. L., Scheff S. W., Hunsaker J. C., Liu H., Landers T. & Gross D. R., 1994. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* 126, 88-94.
- Sperber A. D., Henkin Y., Zuili I., Bearman J. E. & Shany S., 1991. The hypocholesterolemic effect of an antacid containing aluminum hydroxide. *Am. J. Med.* 91, 597-604.
- Stadtman E. R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797-821.
- Stanimirovic D. B., Wong J., Ball R. & Durkin J. P., 1995. Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: relationship between lipid peroxidation,  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase activity, and  $^{51}\text{Cr}$  release. *Neurochem. Res.* 20, 1417-1427.
- Stocchi V., Cucchiaroni L., Chiarantini L., Palma P. & Crescentini G., 1985. Simultaneous extraction and reverse-phase high performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal. Biochem.* 46, 118-124.
- Stoffel-Wagner B., 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 669-679.

- Strong M. J., Garruto R. M., Joshi J. G., Mundy W. R. & Shafer T. J., 1996. Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a unified scheme? *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 599-613.
- Struys-Ponsar C., Kerkhofs A., Gauthier A., Soffic M. & van der Bosch de Aguilar P., 1997. Effects of aluminum exposure on behavioral parameters in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 643-648.
- Sturman J. A., Wisniewski H. M. & Shek J. W., 1983. High affinity uptake of GABA and glycine by rabbits with aluminum-induced neurofibrillary changes. *Neurochem. Res.* 8, 1097-1109.
- Suzuki K. & Sheetz M. P., 2001. Binding of cross-linked glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to discrete actin-associated sites and cholesterol-dependent domains. *Biophys. J.* 81, 2181-2189.
- Svoboda P., Teisinger J. & Vyskocil F., 1984. Vanadyl ( $\text{VO}^{2+}$ ) induced lipoperoxidation in the brain microsomal fraction is not related to  $\text{VO}^{2+}$  inhibition of Na,K-ATPase. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2493-2497.
- Sweadner K. J. & Donnet C., 2001. Intersubunit and intrasubunit contact regions of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase revealed by controlled proteolysis and chemical cross-linking. *Biochem. J.* 356, 685-704.
- Sweadner K. J., 1979. Two molecular forms of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J. Biol. Chem.* 254, 6060-6067.
- Sweadner K. J., 1985. Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry. *J. Biochem.* 260, 11508-11513.
- Sweadner K. J., 1989. Isozymes of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 185-220.
- Sweadner K. J., 1992. Overlapping and diverse distribution of Na/K ATPase isozymes in neurons and glia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, S255-S259.
- Sweadner K. J., Herrera V. L., Amato S., Moellmann A., Gibbons D. K. & Repke K. R., 1994. Immunologic identification of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase isoforms in myocardium. Isoform change in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Circ. Res.* 74, 669-678.

- Szotowicz A., Bielarczyk H., Kisielewski Y., Jankowska A., Madziar B. & Tomaszewicz M., 1998. Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria
- Szutowicz A. J., 2001. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 1009-1018.
- Takeda K. & Kawamura M., 2001. The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alphabeta protomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1364-1366.
- Taniguchi K., Kaya S., Abe K. & Mardh S., 2001. The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J. Biochem.* 129, 335-342.
- Taylor G. A., Moore P. B., Ferrier I. N., Tyrer S. P. & Edwardson J. A., 1998. Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man. *J. Inorg. Biochem.* 69, 165-169.
- Therien A. G. & Blostein R., 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C541-C566.
- Therien A. G., Pu H. X., Karlsh S. J. D. & Blostein R., 2001. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 407-414.
- Thoenges D., Amler E., Eckert T. & Schoner W., 1999. Tight binding of bulky fluorescent derivatives of adenosine to the low affinity E<sub>2</sub>ATP site leads to inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Analysis of structural requirements of fluorescent ATP derivatives with a Koshland-Nemethy-Filmer model of two interacting ATP sites. *J. Biol. Chem.* 274, 1971-1978.
- Tilson H. A. & Cabe P. A., 1978. Strategy for the assessment of neurobehavioural consequences of environmental factors. *Environ. Health Perspect.* 26, 287-299.
- Tilson H. A., 1990. Neurotoxicology in the 1990s. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, 293-300.
- Tilson H. A., MacPhail R. C., Moser V. C., Becking G. C., Cuomo V., Frantik E., Kulig B. M. & Winneke G., 1997. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: VII. Summary and conclusions. *Neurotoxicology* 18, 1065-1069.
- Trapp G. A., 1983. Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sci.* 33, 311-316.
- Urayama O., Shutt H. & Sweadner K. J., 1989. Identification of three isozyme proteins of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase in rat brain. *J. Biol. Chem.* 264, 8271-8280.

- Urban S., Zieseniss S., Werder M., Hauser H., Budzinski R. & Engelmann B., 2000. Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells. *J. Biol. Chem.* 275, 33409-33415.
- Vallée M., Shen W., Heinrichs S. C., Zorumski C.F., Covey D. F., Koob G.F. & Purdy R.H., 2001. Steroid structure and pharmacological properties determine the anti-amnesic effects of pregnolone sulphate in the passive avoidance task in rats. *Eur. J. Neurosci.* 14, 2003-2010.
- Van Rensburg S. J., Carstens M. E., Potocnik F. C., Aucamp A. J., Taljaard J. J. & Koch K. R., 1992. Membrane fluidity of platelets and erythrocytes in patients with Alzheimer's disease and the effect of small amounts of aluminium on platelet and erythrocyte membranes. *Neurochem. Res.* 17, 825-829.
- Van Rensburg S. J., Daniels W. M. V., Vazyl J., Potocnik F. C. V., Vanderwalt B. J. & Taljaard J. J. F., 1994. Lipid peroxidation and platelet membrane fluidity - implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5, 2221-2224.
- Van Rensburg S. J., Daniels W. M., Potocnik F. C., van Zyl J. M., Taljaard J. J & Emsley R. A., 1997. A new model for the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aluminium toxicity is exacerbated by hydrogen peroxide and attenuated by an amyloid protein fragment and melatonin. *S. Afr. Med. J.* 87, 1111-1115.
- Vasilets L. A. & Schwarz W., 1993. Structure-function relationships of cation binding in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 201-222.
- Vassault A., Grafmeyer D. & Naudin C., 1983. Protocole de validation de techniques (document B). *Ann. Biol. Clin.* 44, 686-745.
- Venugopal B. & Luckey T. D., 1978. Metal Toxicity in Mammals. *Chemical Toxicity of Metals and Metalloids*. Vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 104-112.
- Verstraeten S. V. & Oteiza P. I., 2000. Effects of  $\text{Al}^{3+}$  and related metals on membrane phase state and hydration: correlation with lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 340-346.
- Verstraeten S. V., Erleijman A. G., Zago M. P. & Oteiza P. I., 2002. Aluminum affects membrane physical properties in human neuroblastoma (IMR-32) cells both before and after differentiation. *Arch of Biochem Biophys.* 399, 167-173.



- Verstraeten S. V., Keen C. L., Golub M. S. & Oteiza P. I., 1998. Membrane composition can influence the rate of  $\text{Al}^{3+}$ -mediated lipid oxidation: effect of galactolipids. *Biochem. J.* 333, 833-838.
- Verstraeten S. V., Nogueira L. V., Scheier S. & Oteiza P. I., 1997. Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 121-127.
- Vilsen B., Andersen J. P., Petersen J. & Jorgensen P. L., 1987. Occlusion of  $^{22}\text{Na}^+$  and  $^{86}\text{Rb}^+$  in membrane-bound and soluble protomeric  $\alpha\beta$ -subunits of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 262, 10511-10517.
- Walton J., Tuniz C., Fink D., Jacobsen G. & Wilcox D., 1995. Uptake of trace amounts of aluminum into the brain from drinking water. *Neurotoxicology* 16, 187-190.
- Ward D. G. & Cavierres J. D., 1993. Solubilized  $\alpha\beta$  Na,KATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity towards ATP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 5332-5336.
- Ward R. J., Zhang Y. & Crichton R. R., 2001. Aluminium toxicity and iron homeostasis. *J. Inorg. Biochem.* 87, 9-14.
- Water Research Center (UK), 1990. Review of working documents for the revision of the World Health Organisation guideline for drinking-water quality, Geneva, World Health Organization collaborative center for drinking water and water pollution control.
- Weis C. & Haug A., 1989. Aluminium-altered membrane dynamics in human red blood cell white ghosts. *Thromb. Res.* 54, 141-149.
- WHO (World Health Organization), 1997. Environmental Health Criteria 194. Aluminium. Geneva.
- WHO (World Health Organization), 2001. Neurotoxicity risk assessment for human health: principles and approaches. (Environmental health criteria; 223), Geneva.
- Wills M. R. & Savory J., 1988. Aluminum toxicity and chronic renal failure. In: Metal ions in biological systems. Sigel H. & Sigel A. (eds.), Marcel Dekker, inc. New York & Basel, 24, pp. 315-340.
- Wolff F. A., Berend K. & van der Voet G. B., 2002. Subacute fatal aluminum poisoning in dialyzed patients: post-mortem toxicological findings. *Forensic Sci. Int.* 128, 41-43.

- Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G. G. & Siegel G., 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57, 1439-1443.
- Womale F. C. & Colowick S. P., 1979. Proton dependent inhibition of yeast and brain hexokinase by aluminum in ATP preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 16, 50-80.
- Wong P. C., Lai J. C., Lim L. & Davison A. N., 1981. Selective inhibition of L-glutamate and gamma-aminobutyrate transport in nerve ending particles by aluminium, manganese, and cadmium chloride. *J. Inorg. Biochem.* 14, 253-260.
- Wood W. G., Schroeder F., Hogy L., Rao A. M. & Nemezc G., 1990. Asymmetric distribution of a fluorescent sterol in synaptic plasma membranes: effects of chronic ethanol consumption. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 243-246.
- Wu J., Du F., Zhang P., Khan I. A., Chen J. & Liang Y., 2005. Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: Implications for the biological function of aluminum. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1145-1154.
- Xie C. X. & Yokel R. A., 1996. Aluminium facilitation of iron mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 222-226.
- Xie C. X., Mattson M. P., Lovell M. A. & Yokel R. A., 1996. Intraneuronal aluminum potentiates iron-induced oxidative stress in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 743, 271-277.
- Xie Z. & Cai T., 2003.  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 3, 157-68.
- Yallapragada P. R., Butler J., Kumar B. K. & Rajanna B., 2003. *In vitro* effect of lead on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in different regions of adult rat brain. *Drug Chem. Toxicol.* 26, 117-124.
- Yokel R. A. & McNamara P. J., 2001. Aluminium toxicokinetics: An updated minireview. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 159-167.
- Yokel R. A., 1983. Repeated systemic aluminum exposure effects on classical conditioning of the rabbit. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5, 41-46.
- Yokel R. A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813-828.

- Yokel R. A., Allen D. D. & Ackley D. C., 1999. The distribution of aluminium into and out of the brain. *J. Inorg. Biochem.* 76, 127-132.
- Yokel R. A., Allen D. D. & Meger J. J., 1994. Studies of aluminium neurobehavioral toxicity in the intact mammal. *Cell. Molec. Neurobiol.* 14, 791-808.
- Yokel R. A., Wilson M., Harris W. R. & Halestrap A. P., 2002. Aluminum citrate uptake by immortalized brain endothelial cells: implications for its blood--brain barrier transport. *Brain Res.* 930, 101-110.
- Yoshino M., Ito M., Haneda M., Tsubouchi R. & Murakami K., 1999. Prooxidant action of aluminum ion-stimulation of iron - mediated lipid peroxidation by aluminum. *Biometals* 12, 237-240.
- Yousef M. I., 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199, 47-57.
- Yu S. P., 2003. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601-1609.
- Yumoto S., Nagai H., Kobayashi K., Tamate A., Kakimi S. & Matsuzaki H., 2003. <sup>26</sup>Al incorporation into the brain of suckling rats through maternal milk. *J. Inorg. Biochem.* 97, 155-160.
- Zajchowski L. D. & Robbins S. M., 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* 269, 737-752.
- Zatta P., Lucchini R., van Rensburg S. J. & Taylor A., 2003. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res. Bull.* 62, 15-28.
- Zatta P., Zambenedetti P., Bruna V. & Filippi B., 1994. Activation of acetylcholinesterase by aluminium(III): The relevance of the metal species. *NeuroReport* 5, 1777-1780.
- Zatta P., Zambenedetti P., Pizziuti A. & Perazzolo M., 1995. Different effects of aluminum upon carbonic anhydrases and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in rat. *Neurosci. Lett.* 197, 65-68.
- Zatta P., Zambenedetti P., Toffoletti A., Corvaja C. & Corain B., 1997. Aluminum (III) induces alterations on the physical state of the erythrocytic membrane: an ESR evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 65, 109-114.

Zubenko G. S., 1990. Significance of increased platelet membrane fluidity in mental disorders of late-life. Ups. J. Med. Sci. Suppl. 48, 225-244.